

**VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN
VON NÄHRBÖDEN FÜR DIE ZÜCHTUNG
VON BIFIDOBAKTERIEN**

BIRGITTA GOERKE-VOGEL

Disbui. München

1987



Aus dem Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene
und Medizinische Mikrobiologie der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Friedrich Deinhardt

**VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN VON NÄHRBÖDEN
FÜR DIE ZÜCHTUNG VON BIFIDOBAKTERIEN**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Birgitta Goerke-Vogel
aus
Kumla

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. G. Ruckdeschel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Forth
Prof. Dr. F. Eiden

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Spann

Tag der mündlichen

Prüfung: 18.12.1987

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. BESCHREIBUNG UND KLASSIFIZIERUNG DER BIFIDO- BAKTERIEN	3
2.1. Morphologie	3
2.2. Züchtungsbedingungen und Koloniemorphologie	3
2.3. Zusammensetzung von Zellwand, Lipidkomponen- ten und Nukleinsäuren	4
2.4. Klassifizierung	5
2.4.1. Historischer Abriß	5
2.4.2. Beschreibung der beim Menschen vorkommenden Bifidobakterienarten nach Bergey's Manual 1986	7
3. STOFFWECHSEL DER BIFIDOBAKTERIEN	10
3.1. Abbau von Kohlenhydraten	10
3.1.1. Glukosefermentation	10
3.1.2. Abbau anderer Kohlenhydrate	10
3.2. Metabolisierung von Stickstoffverbindungen	11
3.3. Sonstige metabolische Aktivitäten	11
4. BEDEUTUNG DER BIFIDOBAKTERIEN IN DER MEDIZIN UND PHARMAZIE	13
4.1. Bifidobakterien in der Normalflora des Menschen	13
4.1.1. Gastrointestinaltrakt	13
4.1.2. Oropharynx	18
4.1.3. Vagina	18
4.3. Bifidobakterien als Bestandteile von Arznei- mitteln	19
4.3.1. Präparate	19
4.3.2. Anwendungsgebiete	20
4.3.3. Nutzen der Therapie mit Bifidobakterien	20
4.4. Sonstige Bedeutung der Bifidobakterien	21

	Seite
4.4.1.	Vorkommen von Bifidobakterien bei Tieren 21
4.4.2.	Bifidobakterien als Faekalindikator 21
4.4.3.	Bedeutung in der Lebensmitteltechnologie 22
5.	PRINZIPIEN DER ZÜCHTUNG VON BIFIDOBAKTERIEN UND LAKTOBAZILLEN 24
5.1.	Entwicklung der Nährböden 24
5.2.	Bestandteile der Nährböden für Bifidobakterien und Laktobazillen 32
5.2.1.	Stickstoffquellen 32
5.2.2.	Kohlenstoffquellen 32
5.2.3.	Wuchsfaktoren 32
5.2.4.	Zusätze zur Senkung des Redoxpotentials 33
5.2.5.	Indikatoren 33
5.2.6.	Puffersubstanzen 34
5.2.7.	Hemmstoffe 34
5.3.	Auswahl der Nährböden 36
5.3.1.	Standardnährböden 36
5.3.2.	Selektivnährböden 36
5.4.	Herstellungsvorschriften für die verwendeten Nährböden 38
5.4.1.	Fertignährböden - Vergleich mit den Originalrezepten 38
5.4.1.1.	APT-Agar (All Purpose Media with Tween, Merck 10454) 38
5.4.1.2.	Eugon-Agar (Bio Mérieux 51341, BBL 11230) 38
5.4.1.3.	Rogosa-Agar (Merck 5413, Oxoid CM 627, BBL 11327) 39
5.4.1.4.	Sorbinsäure-Agar (Merck 10451) 39
5.4.1.5.	Tomatensaft-Agar (Oxoid CM 113, Pasteur 58, Difco B 31, Difco B 389, BBL 11327) 40
5.4.1.6.	Milch-Agar (Oxoid CM 21) 41
5.4.2.	Herstellungsvorschriften für die nicht im Handel verfügbaren Nährböden 41

	Seite
5.4.2.1. Pepton-Hefeextrakt-Saccharose-Tween-Medium nach KOTARSKI und SAVAGE, PYST (39)	41
5.4.2.2. YN 6-Medium nach RESNICK und LEVIN (59)	41
5.4.2.3. Leber-Zystin-Milchzucker-Agar nach BLAU-ROCK (15)	42
5.4.2.4. Tryptikase-Phyton-Glukose-Medium nach ATCC	44
5.4.2.5. Glukose-Leber-Agar nach OCHI (58)	44
5.4.2.6. Petuely-Medium (57)	45
5.4.2.7. Fleisch-Hefe-Agar nach BEERENS (VL,10)	48
5.4.2.8. Medium nach ROGOSA und MITCHELL für glatte Kolonieoberflächen (65)	48
5.4.2.9. Pepton-Hefeextrakt-Glukose-Pansenflüssigkeit-Medium , PYG-RF, nach YOKOYAMA und Mitarbeitern (87)	49
 6. MATERIAL UND METHODEN	
6.1. Versuchsplan	59
6.2. Nährböden und Stämme	59
6.2.1. Nährböden	59
6.2.2. Stämme	60
6.2.2.1. Bifidobakterien	60
6.2.2.2. Bakterien anderer Gattungen	61
6.3. Methoden	63
6.3.1. Vorversuche zur Überprüfung der Versuchsbedingungen	63
6.3.1.1. Prüfung der Aerotoleranz	63
6.3.1.2. Ermittlung der optimalen Schüttelzeit	64
6.3.1.3. Ermittlung der Bebrütungsdauer und Prüfung verschiedener anaerober Kulturverfahren	64
6.3.2. Vergleichende quantitative Prüfung des Wachstums der Bifidobakterien auf den Nährböden	65
6.3.3. Vergleichende quantitative Prüfung der selektiven Eigenschaften der Nährböden mit Bakterienarten anderer Gattungen als Bifidobacterium	67

	Seite
6.3.4. Untersuchung von Arzneyspezialitäten und Joghurtzubereitungen	68
6.3.5. Untersuchung zur Tauglichkeit der Nährböden für den quantitativen Nachweis von Bifidobakterien aus dem Speichel	70
6.3.6. Untersuchung zur Tauglichkeit der Nährböden für den quantitativen Nachweis von Bifidobakterien aus dem Stuhl	71
6.3.7. Untersuchung zur Tauglichkeit der Nährböden für den quantitativen Nachweis von Bifidobakterien aus dem Vaginalsekret	71
6.4. Statistische Auswertung	72
 7. ERGEBNISSE	
7.1. Vorversuche zur Prüfung der Versuchsbedingungen	73
7.1.1. Aerotoleranz	73
7.1.2. Desintegration von Zellverbänden	73
7.1.3. Bebrütungsdauer, Herstellung anaerober Verhältnisse	73
7.2. Ergebnisse der vergleichenden Untersuchung des Wachstums der Bifidobakterien auf den verwendeten Nährböden	74
7.2.1. Quantitative Ergebnisse	74
7.2.2. Qualitative Ergebnisse	74
7.3. Ergebnisse der vergleichenden quantitativen Prüfung der selektiven Eigenschaften der Nährböden mit Bakterien anderer Gattungen als Bifidobacterium sp.	82
7.3.1. Quantitative Ergebnisse	74
7.3.2. Qualitative Ergebnisse - Koloniemorphologie von Laktobazillen	88
7.4. Ergebnisse der Untersuchung von Arzneyspezialitäten und Joghurtzubereitungen	88
7.4.1. Arzneyspezialitäten	88

	Seite
7.4.1.1. Ribolac ^R	88
7.4.1.2. Omniflora ^R	89
7.4.1.3. Döderlein Med ^R	89
7.4.1.4. DE Medinova ^R	89
7.4.1.5. Eugalan ^R	90
7.4.1.6. Quantitative Aspekte	90
7.4.2. Joghurtzubereitungen	90
7.4.2.1. Biodyn Trinkjoghurt	91
7.4.2.2. Bifighurt	91
7.4.2.3. BA aktiv	91
7.4.2.4. Quantitative Aspekte	91
7.5. Ergebnisse der Untersuchung zu Tauglichkeit der Nährböden zum quantitativen Nachweis von Bifidobakterien aus Speichel	92
7.6. Ergebnisse der Untersuchung zur Tauglichkeit der Nährböden zum quantitativen Nachweis von Bifidobakterien aus dem Stuhl	95
7.7. Ergebnisse der Untersuchung zur Tauglichkeit der Nährböden für den quantitativen Nachweis von Bifidobakterien aus dem Vaginalsekret	98
8. DISKUSSION	103
8.1. Prinzipielle Überlegungen	103
8.2. Vorversuche zur Methodik	106
8.3. Eignung der nichtselektiven und selektiven Nährböden zum quantitativen Nachweis von Bifi- dobakterien	107
8.4. Praktische Prüfung an verschiedenen Mate- rialien	114
8.5. Schlußbetrachtung	125
9. ZUSAMMENFASSUNG	125
10. LITERATUR	127

1. Einleitung

Bifidobakterien und Laktobazillen sind hetero- bzw. homofermentative Milchsäurebildner, die in der Natur, besonders aber in der Normalflora des Menschen und vieler Tiere, in großer Zahl und Vielfalt vorkommen. Die beiden Bakteriengruppen werden oft verwechselt und sind tatsächlich wegen einer Reihe gemeinsamer Eigenschaften nicht leicht zu unterscheiden.

Bifidobakterien und Laktobazillen gelten als apathogen; als eigenständige Krankheitserreger werden sie außerordentlich selten gefunden. Dagegen wird diesen Bakterien als Bestandteil der physiologischen Besiedelung besondere Bedeutung zugemessen. Sie repräsentieren einen erheblichen Teil der Flora des Verdauungstraktes, nicht nur im Dickdarm, sondern auch in den höher gelegenen Abschnitten; sie bilden die wesentlichen Bestandteile der Vaginalflora und kommen auch im Oropharynx regelmäßig vor. Die Wirkung auf den Wirtsorganismus ist bis heute noch weitgehend ungeklärt, aber es gibt genügend Hinweise, die auf einen günstigen Einfluß deuten, so daß diese Bakterien möglicherweise als einzige unter den zahlreichen Arten der körpereigenen Flora in wirklicher Symbiose mit dem Wirt leben. Deshalb werden Vertreter der beiden Bakteriengruppen vielfach als Bestandteile von Arzneimitteln und diätetischen Lebensmitteln verwendet.

Mikroökologische Untersuchungen über die Beschaffenheit und Funktion der physiologischen Besiedelung des Menschen und der Tiere gestalten sich wegen der komplexen Zusammensetzung dieser Biotope sehr mühevoll. Die wichtigste Voraussetzung, vor allem für die quantitativen Analysen, sind leistungsfähige Nährböden mit guten Wachstumseigenschaften und möglichst auch ausreichender Selektivität gegenüber anderen Gruppen von Mikroorganismen. Viele Nährböden wurden bisher entwickelt, um Bifidobakterien und Laktobazillen an ihren natürlichen



Standorten nachzuweisen. In dieser Arbeit soll ihre Eig-
nung für diesen Zweck vergleichend untersucht werden.

2. Beschreibung und Klassifizierung der Bifidobakterien

2.1. Morphologie

Bifidobakterien sind grampositive Stäbchen mit großer Variabilität der Form. Sie treten einfach und verzweigt auf; in Y- oder V-Form gegabelte, keulen- oder spatelförmige Stäbchen lassen sich vor allem aus frisch isolierten Kulturen nachweisen. Die Form kann durch unterschiedliche Nährbedingungen oder durch das Anlegen von Subkulturen beeinflusst werden, wobei unter ungünstigen Kulturbedingungen die Verzweigungen zunehmen. Als mögliche Gründe für die zunehmende Verzweigung gelten Mangel an N-Acetylaminozuckern, Kalziumionen oder bestimmten Aminosäuren (58).

Bifidobakterien färben sich in der Gramfärbung oft unregelmäßig an; sie sind nicht säurefest und bilden keine Sporen (14).

2.2. Züchtungsbedingungen und Koloniemorphologie

Bifidobakterien sind obligate Anaerobier; in Gegenwart von Kohlendioxid wird aber gelegentlich eine gewisse Aerotoleranz beobachtet. In Gegenwart von Sauerstoff hemmt entstehendes Wasserstoffperoxid die Fruktose-6-Phosphoketolase, ein Schlüsselenzym der Fermentation der Bifidobakterien. Als Grund für die relative Aerotoleranz einzelner Stämme wird eine geringe Katalaseaktivität oder die Abwesenheit von Wasserstoffperoxid angeführt (58,41). Laktobazillen können dagegen auch aerob wachsen (13).

Die optimale Wachstumstemperatur für Bifidobakterien vom Menschen liegt bei 36°C bis 38°C; die bei Tieren auftretenden Stämme wachsen bei höheren Temperaturen, bis zu 46,5°C.

Der optimale pH Wert der Nährböden liegt zwischen 6 und 7, unter pH 5,5 wachsen die Bifidobakterien nicht. Laktobazil-

len können dagegen teilweise im sauren Milieu bis pH 3,5 wachsen (85).

Morphologisch lassen sich Bifidobakterien und Laktobazillen oft nur schwer voneinander unterscheiden. Nach vier- bis sechstägiger Bebrütung in anaerober Atmosphäre treten bei beiden Arten 0,5 - 3 mm große, weiße bis gelbliche, auf einigen Nährböden auch rötliche Kolonien auf. Form und Oberfläche der Kolonien variieren stark, je nach Nährboden und Inokulummenge. Allerdings sind bei den Bifidobakterien häufig glänzende, gewölbte Kolonien zu beobachten; bei Laktobazillen treten dagegen eher flache, matte Kolonien auf (vgl.7)

2.3. Zusammensetzung von Zellwand, Lipidkomponenten und Nukleinsäuren

Das Mureingerüst ist bei den Bifidobakterien aus Muraminsäure, Glukosamin, Alanin, Glutaminsäure und Ornithin oder Zystin in Verbindung mit einer oder zwei der Aminosäuren Glyzin, Serin, Asparaginsäure oder Threonin aufgebaut.

Die Saccharide der Zellwand sind Glukose, Galaktose und Rhamnose (41). Hinsichtlich der Phospholipidzusammensetzung unterscheiden sich Bifidobakterien merklich von Laktobazillen; gewisse Phospholipide, beispielsweise Polyglycerolphospholipide und ihre Derivate, treten nur bei den Bifidobakterien, nicht jedoch bei den Laktobazillen auf (58).

Deutliche Unterschiede gibt es auch in der Zusammensetzung der Nukleinsäuren. Der Gehalt an Guanin und Zytosin beträgt bei den Bifidobakterien ca. 60,1%, bei den Laktobazillen 50,0% (58).

2.4. Klassifizierung

2.4.1. Historischer Abriß

Im Jahre 1900 beschrieb TISSIER ein anaerobes, grampositives, gebogenes Stäbchen als Leitkeim der Darmflora des Brustkindes und bezeichnete es als *Bacillus bifidus* (78).

MORO entdeckte 1900 ein fakultativ anaerobes Stäbchen, das er *Bacillus acidophilus* nannte und als Leitkeim der Flora des Flaschenkindes bezeichnete (58). Die Theorie, nach der Bifidobakterien nur bei Brustkindern aufträten und alle ähnlichen Organismen an anderen Standorten als Laktobazillen zu bezeichnen seien, war noch lange in der Literatur anzutreffen (37).

ORLA-JENSEN, der bereits 1919 biochemische Unterschiede, besonders in Bezug auf die Glukosefermentation, zwischen den beiden Bakterien festgestellt hatte (50), prägte 1924 den Begriff *Bifidobacterium bifidum* (14). In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde die Gattung *Bifidobacterium* in der bakteriologischen Systematik immer wieder anders untergebracht, so bei den Nokardien, Aktinomyzeten und Korynebakterien.

Im Jahre 1935 nahm EGGERTH erstmals eine Unterteilung der Bifidobakterien aus dem menschlichen Darm in zwei Untergruppen vor (27).

DEHNERT baute 1957 auf EGGERTHs Untersuchungen auf, er gliederte die Bifidobakterien beim Menschen aufgrund ihrer Kohlenhydratfermentation in fünf Biotypen (23).

Mitsuoka klassifizierte 1969 erstmals die Bifidobakterien bei Tieren, verwendete aber nach wie vor die Fermentation von Kohlenhydraten als einziges Differenzierungskriterium (49).

SCARDOVI und Mitarbeiter untersuchten in den Jahren 1969 bis

1974 die Basenzusammensetzung der DNS bei Bifidobakterien; sie verwendeten die DNS-Homologie als zusätzliches Unterscheidungsmerkmal (58).

In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8. Auflage, 1974 (13) werden Laktobazillen und Bifidobakterien zwei verschiedenen Familien, nämlich Lactobacillaceae und Actinomycetaceae zugeordnet. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1. Auflage, 2. Band, 1986 (14) werden sie ohne Zuordnung zu einer bestimmten Familie aufgeführt.

Tab.1

Klassifizierung der Bifidobakterien nach Bergey's Manual (13,14)

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8.Aufl.1974 (13)	Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1. Auflage 1986 (14)
Bifidobakterien vom Menschen	
B. bifidum	B. bifidum
B. adolescentis	B. longum
B. infantis	B. infantis
B. breve	B. breve
B. longum	B. adolescentis
	B. angulatum
	B. catenulatum
	B. pseudocatenulatum
	B. dentium
Bifidobakterien von Tieren	
B. pseudolongum	B. globosum B. boum
B. thermophilum	B. pseudolongum B. magnum
B. suis	B. cuniculi B. pullorum
B. asteroides	B. choerinum B. suis
B. indicum	B. animalis B. minimum
B. coryneforme	B. thermophilum B. subtile

2.4.2. Beschreibung der beim Menschen vorkommenden Bifidobakterienarten nach Bergey's Manual 1986 (14)

- *Bifidobacterium bifidum*

B. bifidum kommt in den Faezes von Säuglingen und Erwachsenen, sowie in der Vagina vor. Die Morphologie ist stark variabel, gelegentlich treten amphorenartige Zellformen auf. Zwei Serotypen werden unterschieden, der Typ a, der besonders beim Erwachsenen und der Typ b, der beim Säugling vorkommt (61). Beide Typen unterscheiden sich auch im Fermentationsmuster für Saccharose, Melibiose und Maltose.

- *Bifidobacterium longum*

B. longum kann aus den Faezes von Erwachsenen und Säuglingen und aus klinischen Proben isoliert werden. Die Spezies ist durch besonders lange und dünne Stäbchen charakterisiert. Aufgrund der Kohlenhydratspaltung werden zwei Biotypen unterschieden. Typ a dominiert beim Erwachsenen, Typ b beim Säugling. Charakteristisch für *B. longum* ist das Vorkommen zahlreicher Plasmide.

- *Bifidobacterium infantis*

B. infantis gilt als Leitkeim der Darmflora des Brustkindes und kommt auch in klinischen Proben und in der Vagina vor. Es handelt sich um verzweigte Stäbchen ohne besondere zusätzliche Charakteristika; *B. infantis* ist von *B. longum* oft schwer zu unterscheiden. Pentosen werden von *B. infantis* nicht gespalten; die Unfähigkeit, Arabinose zu verwerten, gilt als Abgrenzungsmerkmal gegenüber *B. longum*. Es werden auch Übergangsformen zwischen *B. infantis* und *B. longum* angetroffen. Die Arten *B. liberorum* und *B. lactentis* besitzen die gleiche Nukleinsäurezusammensetzung wie *B. infantis*, unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der Kohlenhydratverwertung (61).

- *Bifidobacterium breve*

B. breve kommt in den Faezes und der Vagina des Menschen

vor. Es handelt sich um besonders kleine und dünne Bakterien. In der Struktur der DNS besteht enge Verwandtschaft zu *B. infantis* und *B. longum*. Durch die Stärkereaktion läßt sich *B. parvulorum* von *B. breve* unterscheiden; da keine weiteren Unterschiede bestehen, wird *B. parvulorum* der Spezies *B. breve* zugeordnet (58).

- ***Bifidobacterium adolescentis***

B. adolescentis läßt sich beim Menschen aus den Faezes nachweisen. Die Stäbchen sind in typischer Weise verzweigt, besitzen jedoch keine zusätzlichen Charakteristika. Nach REUTER (61) werden vier Biotypen unterschieden. Die Biotypen b und d können äußerlich nicht von *B. dentium* unterschieden werden; es besteht lediglich ein unterschiedliches elektrophoretisches Trennungsverhalten bei den Transaldolasen.

- ***Bifidobacterium angulatum***

B. angulatum kann aus den Faezes von Erwachsenen und aus Silage nachgewiesen werden. Die Zellen treten oft in V-Form auf, Verzweigungen sind selten. Die Spezies *B. angulatum* besitzt eine stärkere Aerotoleranz als andere Bifidobakterien. Zur Differenzierung dienen das elektrophoretische Trennungsverhalten der Transaldolasen und die Sorbitvergärung.

- ***Bifidobacterium catenulatum***

B. catenulatum kommt bei Erwachsenen und Säuglingen in den Faezes vor. Charakteristisch sind kettenförmige Zellanordnungen aus drei oder mehr Elementen. Die Spezies wurde zeitweise *B. adolescentis* zugeordnet; es bestehen jedoch Unterschiede in der Sorbitvergärung. Für die Züchtung von *B. catenulatum* müssen Riboflavin und Pantothen zur Verfügung stehen. Zu *B. pseudocatenulatum* besteht große Ähnlichkeit in der DNS Struktur; die beiden Arten unterscheiden sich allerdings in Bezug auf biochemische und serologische Merkmale. Es werden aber auch Stämme angetroffen, die als

Mischformen zwischen den beiden Spezies gelten müssen.

- **Bifidobacterium pseudocatenulatum**

B. pseudocatenulatum kann aus den Faezes von Säuglingen und Erwachsenen isoliert werden. Morphologisch zeichnet sich diese Spezies durch besonders variable Zellformen aus. Zum Wachstum werden Riboflavin, Pantothenat und Nikotinsäure benötigt. Durch die Melizitose-Reaktion ist eine Abgrenzung zu *B. adolescentis* möglich; *B. catenulatum* unterscheidet sich in der Stärkeverwertung. Aufgrund ihrer Morphologie und der Charakteristika ihrer Transaldolasen können *B. pseudolongum* und *B. angulatum* von *B. pseudocatenulatum* unterschieden werden.

- **Bifidobacterium dentium**

B. dentium kommt in den Faezes von Säuglingen und Erwachsenen, in der Vagina, der Mundhöhle und in kariösen Herden vor. Morphologisch besteht große Ähnlichkeit mit *B. infantis*. Eine Abgrenzung zu *B. infantis* Typ b und d nach REUTER (61) ist nur über das elektrophoretische Trennungverhalten der Transaldolasen und Zellproteine, nicht jedoch phänotypologisch möglich. Die Spezies benötigt zum Wachstum Riboflavin und Pantothenat.

Die weiteren 15 Arten können hauptsächlich aus tierischem Material oder aus Silage nachgewiesen werden.

3. Stoffwechsel der Bifidobakterien

3.1. Abbau von Kohlenhydraten

3.1.1. Glukosefermentation

Bifidobakterien beziehen ihre Stoffwechselenergie auf fermentativem Wege; es handelt sich um einen selten stattfindenden Reaktionsablauf, der den Hexose-Monophosphat-Shunt einschließt (37). Die Glukosespaltung erfolgt heterolaktisch, es entstehen Essigsäure und L(+)-Milchsäure, es wird jedoch kein Kohlendioxid gebildet. In den meisten Fällen wird mehr Essigsäure und weniger Milchsäure gebildet, als man es aufgrund der stöchiometrischen Verhältnisse im Fruktose-6-Phosphat-Shunt erwarten dürfte. Der Grund dafür ist die phosphoroklastische Spaltung in Essigsäure und Ameisensäure, die bei einem Teil des gebildeten Pyruvats auftritt. Diese Spaltung kommt vor allem in der logarithmischen Wachstumsphase vor und ist je nach Stamm und Nährmedium Schwankungen unterworfen. Im Bereich unter pH 6 nimmt das Ausmaß der phosphoroklastischen Spaltung stark ab (41). Aufgrund der Stereospezifität ihrer Laktatdehydrogenase bilden Bifidobakterien bei der Glukosefermentation nur L(+)-Milchsäure (58).

Bei Laktobazillen verläuft der Glukoseabbau homofermentativ oder heterofermentativ. Als Hauptprodukt entsteht zu 85 - 95% Milchsäure unterschiedlicher Stereoisomerie, daneben Essigsäure und Kohlendioxid (13).

3.1.2. Abbau anderer Kohlenhydrate

Zuckerfermentationsreaktionen können zur Unterscheidung einzelner Stämme herangezogen werden; alle Bifidobakterien fermentieren neben Glukose jedoch Galaktose, Fruktose und Laktose. In keinem Fall werden die Monosaccharide Rhamnose, Sorbose und α -Methyl-D-Mannosid und die Alkohole Dulcitol,

Erythrit, Adonit und Glyzerin gespalten (86). Bifidobakterien können auch Disaccharide und Polysaccharide wie Raffinose, Laktulose und N-Acetylglukosamin metabolisieren, nicht jedoch Stärke (58).

3.2. Metabolisierung von Stickstoffverbindungen

Einige Bifidobakterien spalten Harnstoff, darunter Stämme von *B. breve*, *B. adolescentis* und *B. bifidum*. Bei *B. suis* besitzen 80% der Stämme ureolytische Aktivität (14). Nach DRASAR und HILL (26) waren 18% der untersuchten Stämme zur N-Nitrosierung von Aminen befähigt. Andere Stämme können Nitrosamine abbauen; stärker ist die diesbezügliche Aktivität jedoch bei den Laktobazillen (58). Weitere katabole Stoffwechselreaktionen sind die Desaminierung von Putreszin und Kadaverin, sowie die Hydrolyse von Diazoverbindungen (26).

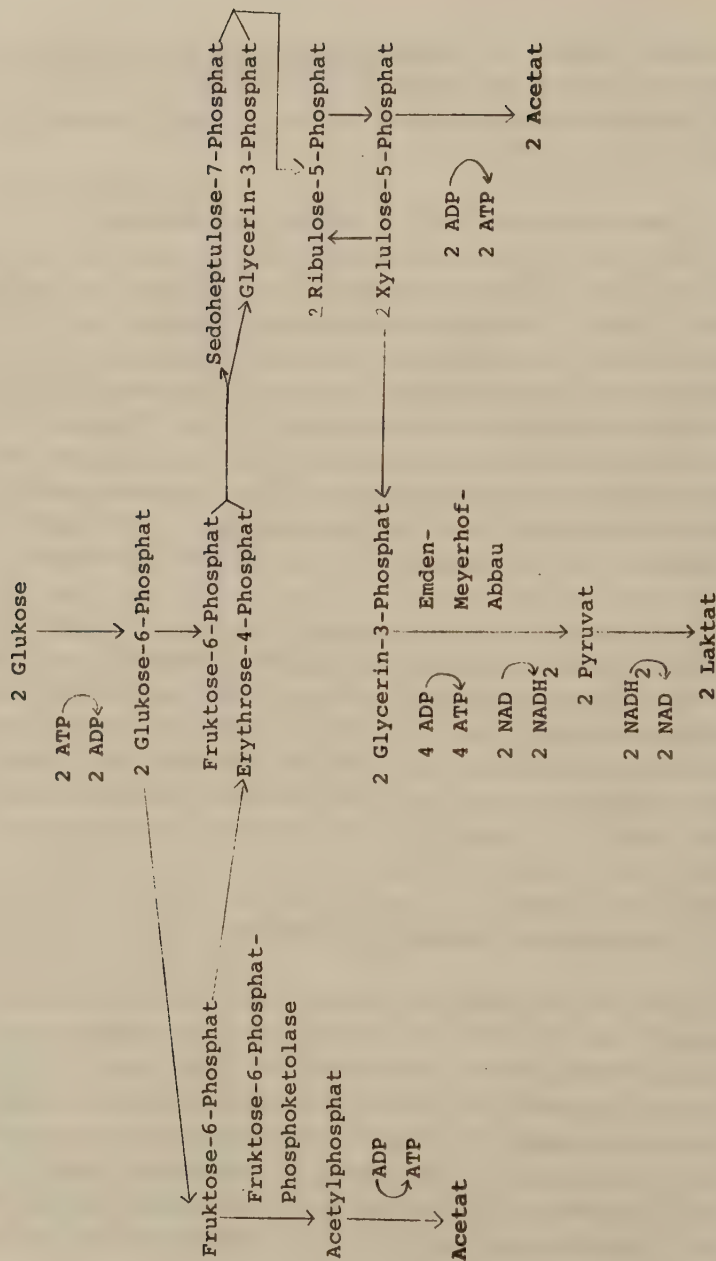
Bifidobakterien bauen die Aminosäuren Ornithin und Prolin, teilweise auch Lysin und Arginin ab; Laktobazillen desaminieren Asparaginsäure und Arginin (26). Bei 32% der Bifidobakterienstämme konnten DRASAR und HILL eine Nitratreduktion nachweisen (26). Der Abbau von Tryptophan zu Indol und die Benzidinspaltung sind bei allen Stämmen negativ. Laktobazillen weisen eine negative Nitratreduktion und Indolreaktion auf.

3.3. Sonstige metabolische Aktivitäten

Bifidobakterien besitzen extrazelluläre gallensäurespaltende Enzyme, insbesondere 7- α -Hydroxycholinoyl-Dehydrogenase (26). Einige Stämme können Cholesterin zu Koprostanol reduzieren. Die Katalasereaktion ist bei den Bifidobakterien ebenso wie bei den Laktobazillen negativ. Bei manchen Stämmen wurde die Bildung einer extrazellulären Dextranase festgestellt (75). An anabolen Reaktionen sind die Bildung einiger Aminosäuren, z.B. Threonin durch *B. bifidum* und Vitamine zu nennen (58).

Abb. 1

Glukosefermentation bei Bifidobakterien



4. Bedeutung der Bifidobakterien in der Medizin und Pharmazie

4.1. Bifidobakterien in der Normalflora des Menschen

4.1.1. Gastrointestinaltrakt

Das saure Milieu des Magens verhindert die Vermehrung der meisten Bakterien, deren Gesamtzahl nur ausnahmsweise 10^3 Koloniebildner (KBE) / ml Magensaft übersteigt (58). In den oberen Abschnitten des Dünndarms liegen die Mengen bei 10^4 , in den unteren Abschnitten bei $10^5 - 10^7$ KBE / ml. Im Dickdarm werden Werte von $10^{10} - 10^{11}$ KBE / g Darminhalt erreicht, das sind auch die aus Stuhlproben bestimmten Zahlen (22). Die Zahlen werden vom Alter des Probanden beeinflusst; ein Zusammenhang mit der Ernährung läßt sich bei Bifidobakterien nicht deutlich nachweisen (58). Beim Brustkind siedeln sich Bifidobakterien zwei bis fünf Tage nach der Geburt im Magen-Darmtrakt an und repräsentieren am Ende der ersten Lebenswoche 99 % der Stuhlflora. Auch bei Flaschenkindern bilden Bifidobakterien den größten Anteil der Faekalflora; die Zahlen liegen um ein bis zwei logarithmische Dekaden niedriger. Im höheren Alter nimmt die Anzahl von Clostridien, Enterobakteriazeen und Streptokokken zu und der Anteil an Bifidobakterien sinkt (58).

Beim Erwachsenen lassen sich besonders *B. adolescentis*, *B. longum*, Biotyp a und b und *B. bifidum*, Biotyp a nachweisen. Bei Säuglingen findet man *B. infantis*, *B. bifidum*, Biotyp b, *B. longum*, Biotyp b und *B. breve* (49).

Während Bifidobakterien zusammen mit *Bacteroides* den Hauptanteil der Dickdarmflora ausmachen, treten Laktobazillen vor allem im Dünndarm auf (68).

Tab.2

Angaben zur Zahl der Bifidobakterien in der Darmflora

	Menge	Autor	Populationen
Magen	N	Sandine (69)	
Oberer Dünndarm	2,0	Sandine (69)	
	5,0	Drasar/Hill (26)	
Unterer Dünndarm	4,0	Sandine (69)	
	4,0	Drasar/Hill (26)	
Dickdarm	7,0	Sandine (69)	
Faezes	10,5	Sandine (69)	
	9,8	Drasar/Hill (26)	England
	9,9	Drasar/Hill (26)	Schottland
	10,1	Drasar/Hill (26)	USA
	9,3	Drasar/Hill (26)	Uganda
	9,6	Drasar/Hill (26)	Indien
	9,7	Drasar/Hill (26)	Japan

Fortsetzung Tab. 2

	Menge	Autor	Populationen
Faezes	9,9	Drasar (25)	England
	9,9	Drasar (25)	Schottland
	9,9	Drasar (25)	USA
	9,4	Drasar (25)	Uganda
	9,6	Drasar (25)	Indien
	9,7	Drasar (25)	Japan

Tab. 3
Angaben zur Zahl der Laktobazillen in der Darmflora

	Menge	Autor	Populationen
Magen	N	Rašić/Kurmann (58)	
Oberer Dünndarm	1,0 6,7	Rašić/Kurmann (58) Drasar/Hill (26)	
Unterer Dünndarm	N-8 6,8	Rašić/Kurmann (58) Drasar/Hill (26)	
Dickdarm	6,5 4-9 N-2,8 N-9	Rašić/Kurmann (58) Drasar/Hill (26) Drasar/Hill (26) Rašić/Kurmann (58)	
Faezes	4,0 4-9 10,5	Rašić/Kurmann (58) Drasar/Hill (26) Sandine (69)	

Fortsetzung Tab.3

	Menge	Autor	Populationen
Faezes	6,5	Drasar/Hill (26)	England
	7,7	Drasar/Hill (26)	Schottland
	6,5	Drasar/Hill (26)	USA
	7,2	Drasar/Hill (26)	Uganda
	7,6	Drasar/Hill (26)	Indien
	7,4	Drasar/Hill (26)	Japan

4.1.2. Oropharynx

Bifidobakterien können regelmäßig aus der Plaque nachgewiesen werden, meist handelt es sich hierbei um Stämme von *B. dentium* (45). Bei Karies im Bereich des Dentins werden neben Laktobazillen und anderen grampositiven Stäbchen auch Bifidobakterien gefunden (45). Der häufigste Stamm bei Karies ist *B. adolescentis*, Biotyp b (58).

Laktobazillen machen einen wesentlichen Bestandteil der Mundflora aus. Eine signifikante Erhöhung ihrer Zahlen gegenüber *Streptococcus mutans* läßt sich beobachten, wenn Fissuren, Kavernen oder Fremdkörper in der Mundhöhle vorhanden sind. Es bildet sich ein geschlossenes System und der pH Wert verschiebt sich in den sauren Bereich, da die puffernde Wirkung des Speichels entfällt. Auch bei zunehmendem Alter der Plaque treten vermehrt Laktobazillen auf. Leitkeim ist *L. casei*, aber auch *L. acidophilus* wird häufig nachgewiesen (34,35).

4.1.3. Vagina

Aus dem Vaginalsekret lassen sich Bifidobakterien häufig, aber nicht regelmäßig isolieren. BARTLETT und Mitarbeiter fanden Bifidobakterien in 2 % der untersuchten Proben; Laktobazillen konnten in 46 % der Proben nachgewiesen werden. Bei beiden Bakterien lag die Anzahl bei etwa 10^8 KBE / g Untersuchungsmaterial (6). Bifidobakterien aus der Vagina gehören meist den Spezies *B. adolescentis*, *B. breve* und *B. longum* an. Die Vaginalflora unterliegt je nach Hormonspiegel starken Schwankungen; die höchsten Werte für Bifidobakterien werden am Ende einer Schwangerschaft erreicht (58).

4.2. Pathogene Bedeutung

Bifidobakterien werden praktisch nie als alleinige Erreger bakterieller Infektionen gefunden. Bei Mischinfektionen konnten sie jedoch in einigen Fällen nachgewiesen werden, so

in Fällen von Peritonitis, Abszessen, Harnwegsinfekten und infektiösen Lungenerkrankungen (58). Auch eine klinisch bedeutsame Bakteriämie mit Bifidobakterien und Eubacterium lentum ist gelegentlich beobachtet worden (22,78).

Laktobazillen wurden in einzelnen Fällen als Erreger von Endokarditis und Sepsis beschrieben; Ausgangspunkt der Infektion waren Erkrankungen im Oropharynxbereich.

4.3. Bifidobakterien als Bestandteile von Arzneimitteln

Durch den Einsatz von Bifidobakterien und Laktobazillen in Form von Arzneimitteln soll das Stoffwechselgeschehen im Darm günstig beeinflusst werden. Zubereitungen mit Laktobazillen werden darüber hinaus eingesetzt, um eine geschädigte Vaginalflora zu normalisieren. Durch die Gabe von Bifidobakterien und Laktobazillen soll die Gefahr einer Besiedelung mit pathogenen Bakterien vermindert werden.

4.3.1. Präparate

In der Bundesrepublik Deutschland sind zwei Zubereitungen im Handel, die Bifidobakterien enthalten (67):

Omniflora^R ist eine Mischung von gefriergetrockneten Kulturen aus *B. bifidum*, *L. acidophilus* und *E. coli*, die in Kapselform verabreicht werden.

Eugalan Töpfer^R ist eine Mischung aus Bifidobakterien und Laktulose mit anderen Kohlenhydraten und Milchpulver.

In Japan werden die Arten *B. thermophilum* und *B. pseudolongum* in Tierarzneimitteln verwendet (58).

L. acidophilus ist in Deutschland in Kapseln, Vaginaltabletten, Pulvern und Vaginalsuppositorien enthalten.

4.3.2. Anwendungsgebiete

Als Indikationen für die Anwendung der Präparate werden angegeben (67):

- Hyperammoniämie bei Leberkoma, Leberinsuffizienz
- Leberzirrhose ohne Koma
- Chronische Obstipation
- Umstimmungstherapie bei gestörter Darmflora

Der Wert der Präparate zur Behandlung der Folgen von Lebererkrankungen wird vielfach angezweifelt, doch soll diese Diskussion hier nicht näher verfolgt werden. Die Symbioselenkung zielt auf eine verbesserte Abwehrlage des Organismus ab; die theoretische Basis dieser Therapie ist derzeit im Detail nur schwach fundiert; dennoch finden die genannten Präparate in der paramedizinischen Praxis weite Anwendung (68). Durch eine Änderung des komplexen Metabolismus im Magen-Darmtrakt soll auch der Entstehung von Karzinomen vorgebeugt werden. Bifidobakterien wurden auch als Trägermaterial für Insulin erprobt; durch diese galenische Maßnahme soll bei einem Kind eine Umstellung von parenteraler auf orale Insulinapplikation ermöglicht worden sein (47).

4.3.3. Nutzen der Therapie mit Bifidobakterien

Die Berichte über Therapieerfolge sind spärlich und beziehen sich meist auf sehr kleine Patientenkollektive oder auf Einzelfälle, es handelt sich nur teilweise um kontrollierte Studien. Oft gehen subjektive Beobachtungen und Erfahrungen in die Beurteilung ein.

Nach den herrschenden Vorstellungen sollen die Bakterien den Magen-Darmtrakt neu besiedeln und in der Folge ihre günstige Wirkung entfalten. Das gelingt jedoch im allgemeinen nicht zuverlässig; lediglich bei Kleinkindern lassen sich Bifidobakterien relativ leicht, wenn auch nur vorübergehend

ansiedeln (41). Beim Erwachsenen ist höchstens eine gewisse Änderung der vielfältigen Stoffwechselfunktionen der Darmflora möglich, wenn die Keime regelmäßig und in geeigneter Form eingenommen werden (58). Die meisten Darreichungsformen, insbesondere auch der Diätetika, erscheinen ungeeignet, weil die Bakterien die Magenpassage nicht überleben. Magensaftresistente Kapseln gewährleisten dies noch am ehesten und die Keimzahl sollte höher als 10^7 liegen. REUTER stellte bei Untersuchungen von Zubereitungen aus Laktobazillen fest, daß diese nicht immer die richtigen Stämme und die deklarierten Mengen enthalten (96).

Bei Anwendung der Kombination von Bifidobakterien und Laktulose fand eine Normalisierung des Blutammoniaks, des freien Phenols und Indikans statt und die Harnstoffsynthese nahm zu (47).

In einigen Fällen bewirkte die Gabe von Bifidobakterien eine Besserung von Analrhagaden, -ekzemen und -mykosen (67).

Ob das Risiko von Kolonkarzinomen durch die Behandlung mit Bifidobakterien bzw. Laktobazillen vermindert werden kann, bleibt vorerst spekulativ (31).

4.4. Sonstige Bedeutung der Bifidobakterien

4.4.1. Vorkommen von Bifidobakterien bei Tieren

Auch bei Tieren kommen Bifidobakterien im Gastrointestinaltrakt und in der Vagina vor. Einzelheiten zeigt die Tabelle 4.

4.4.2. Bifidobakterien als Faekalindikator

Da die Bifidobakterien im Stuhl in wesentlich höheren Zahlen als E. coli vorkommen, wurden sie von RESNICK und LEVIN als Indikator für faekale Kontamination bei Wasseruntersuchungen vorgeschlagen. Ihre Empfindlichkeit und kurze Le-

bensdauer bereitet hier jedoch größte Schwierigkeiten. Aus dem Abwasser wurden hauptsächlich *B. longum* und *B. adolescentis* isoliert (60).

4.4.3. Bedeutung in der Lebensmitteltechnologie

Seit Metchnikoff 1908 seine Theorien zur lebensverlängernden Wirkung von Milchsäurebakterien in fermentierten Milchprodukten aufstellte, finden diese Nahrungsmittel als Diätetika Beachtung (48). In zunehmendem Maße werden auch Bifidobakterien für die Herstellung von Lebensmitteln eingesetzt, insbesondere in Form der Biogarde^R Kulturen, die eine Mischung aus *B. bifidum*, *L. acidophilus* und *S. thermophilus* enthalten (74). Mit Hilfe dieser Starterkulturen werden fermentierte Milchprodukte wie Joghurt oder Dickmilch hergestellt. Bifidobakterien werden gelegentlich auch Gemüsesäften, Tiefkühlprodukten und Säuglingsnahrungsmitteln zugesetzt (58).

Laktobazillen spielen bei Fermentationsprozessen eine dominierende Rolle; sie kommen unter anderem bei der Herstellung von Käse, Sauerkraut und Sauermilchprodukten zum Einsatz (13).

Vorkommen von Bifidobakterien bei Tieren

Spezies	Vorkommen
<i>B. bifidum</i>	Gastrointestinaltrakt von Kälbern
<i>B. adolescentis</i>	Pansen der Wiederkäuer, Faeces von Affe und Hund
<i>B. pseudocatenulatum</i>	Faeces von Kälbern
<i>B. globosum</i>	Faeces von Schwein, Ratte, Kaninchen und Lamm; Pansen
<i>B. pseudolongum</i>	Faeces von Huhn, Rind, Ratte und Maus
<i>B. cuniculi</i>	Faeces von Kaninchen
<i>B. choerinum</i>	Faeces von Ferkeln
<i>B. animalis</i>	Faeces von Ratte, Huhn, Kaninchen, Kalb
<i>B. thermophilum</i>	Faeces von Schwein, Ferkel, Huhn und Kalb; Pansen
<i>B. boum</i>	Faeces von Ferkeln; Pansen
<i>B. magnum</i>	Faeces von Kaninchen
<i>B. pullorum</i>	Faeces von Kühen
<i>B. suis</i>	Faeces von Schweinen
<i>B. coryneforme</i>	Gastrointestinaltrakt von Bienen
<i>B. asteroides</i>	Gastrointestinaltrakt von Bienen
<i>B. indicum</i>	Gastrointestinaltrakt von Bienen

5. Prinzipien der Züchtung von Bifidobakterien und Laktobazillen

5.1. Entwicklung der Nährmedien

Selektivnährböden für Bifidobakterien sind nicht im Handel erhältlich. So muß man bei der Verwendung von Fertignährböden auf Laktobazillenmedien zurückgreifen. Angesichts der großen Ähnlichkeit zwischen Bifidobakterien und Laktobazillen sind die Nährböden oft gleichermaßen für beide Arten geeignet. Teilweise wurden Laktobazillennährböden durch Zusätze für die Kultur von Bifidobakterien modifiziert. Für Bifidobakterien geeignete Nährböden, die ursprünglich für die Anzucht von Laktobazillen vorgesehen waren, werden in den folgenden Abschnitt einbezogen.

TISSIER benutzte als Kultur- und Transportmedium für den *Bacillus bifidus* im Jahre 1905 einen 1 % igen Traubenzuckerschüttelagar (16).

ADAM verwendete 1922 ein Haematinnährmedium mit 1 % Glukose, dem Koks- oder Marmorstückchen zugesetzt wurden (1).

Neben der Verwendung von Nährböden auf der Basis von Glukose und Haematin wurde in den ersten Jahrzehnten des 20. Jahrhunderts auch die Tauglichkeit anderer gebräuchlicher Nährmedien für die Kultur von Bifidobakterien erprobt; so wurden die LÖFFLER-Serumplatte und der Kochblutagar getestet, jedoch ohne nennenswerte Erfolge (16).

MORO wählte 1900 als elektiven Nährboden für Laktobazillen den Bierwürzeagar; auf diesem wuchsen laut BASTEN(1914) auch Streptokokken üppig (8).

BASTEN empfahl für *L. acidophilus* eine 0,5 % ige essigsäure Glukosebouillon.

KULP beschrieb 1927 ein Medium für die Kultur von *L. acido-*

philus, welches neben einem Pepton und peptonisierter Milch lediglich Tomatensaft enthielt. Durch den Zusatz von Tomatensaft konnte ein üppigeres Wachstum erzielt werden als durch einzelne Kohlenhydratkomponenten. Der Autor folger- te daraus, daß im Tomatensaft außer Kohlenhydraten (besonders Hexosen) noch weitere unbekannte Wachsfaktoren vorhanden sein müßten (40). Tomatensaftagar wird heute als Fertignährboden von verschiedenen Herstellern angeboten und für die Zählung von Laktobazillen empfohlen.

ORLA-JENSEN erkannte 1927 die wachstumsfördernde Wirkung von Zystein auf Bifidobakterien und setzte einen Tomaten- saftagar mit Zysteinzusatz ein, auf dem Bifidobakterien im Tiefenwachstum als 2-3 mm große Kolonien erschienen (16).

RAŠIĆ und KURMANN empfahlen 1983 den Zusatz von 0,04 % Sorbin- säure zu Tomatensaftagar, um die Selektivität für Bifidobak- terien zu erhöhen (58).

BLAUROCK entwickelte 1937 einen Leber-Zystein-Milchzuckeragar.

Der Leber-Zystein-Milchzuckeragar wurde 1949 von BOVENTER als bester Nährboden für Bifidobakterien empfohlen.

Eine Variante nach PLOTHO (1947), bei der die Leber durch Magnesium- und Kalziumsalze, Kaliumhydrogenphosphat, Askor- binsäure und p-Aminobenzoessäure ersetzt wurde, erwies sich nach BOVENTER als weniger brauchbar (16).

RAYNAUD und LEVESQUE empfahlen 1959 den Zusatz von 1,2 % Sorbinsäure zur Erhöhung der Selektivität für Bifidobakterien; zur Isolierung der Bifidobakterien aus Säuglingsstühlen setz- ten sie den Zysteingehalt herab (58).

In den Jahren 1940 bis 1950 wurden insbesondere einzelne Wachsstoffe für die Kultur von Laktobazillen untersucht.

VERA prüfte 1947 vier Peptone zusammen mit Hefeextrakt für die Züchtung von Laktobazillen. Es wurden mit Pepsin verdautes Fleisch, mit Pankreasenzymen verdautes Laktalbumin, mit Pankreasenzymen verdautes Casein und mit Pepsin verdautes Sojahydrolysat getestet. Ein Natriumzitratzusatz verbesserte das Wachstum; der Zusatz verschiedener Aminosäuren brachte keine Vorteile (81). Diese Untersuchungen bildeten die Grundlage für den Eugon-Agar, der zur Anzucht anspruchsvoller Keime und für die Nahrungsmittelbakteriologie empfohlen wird.

ROGOSA und MITCHELL führten 1949 Versuche zur Kultivierung heterofermentativer Laktobazillen durch. Es zeigte sich, daß unterschiedliche Kulturbedingungen die Kolonieform verändern, diese Veränderung war reversibel. Sorbitanmonooleat bewirkte allerdings eine komplette Verschiebung von der rauhen zur glatten Kolonieform. Der Nährboden, auf dem glatte Kolonieformen auftraten, enthielt neben hydrolysiertem Casein und Rindermilz chemisch definierte Einzelkomponenten wie Nukleinsäurebasen, Vitamine, Aminosäuren, Mineralsalze und Tween 80. Als Kohlenhydratquelle diente Glukose. Rauhe Kolonieoberflächen zeigten sich auf einem Nährboden, der Peptone, Hefeextrakt, Tomatensaft und Leber, ferner Glukose, Laktose und eine kleine Menge an Tween 80 enthielt (65).

TOMARELLI und Mitarbeiter beschrieben 1949 ein halbsynthetisches Medium für Bifidobakterien, das enzymhydrolysiertes Casein, Aminosäuren, Vitamine, Nukleinsäurebasen, Glukose, Salze und p-Aminobenzoesäure enthielt.

NORRIS und Mitarbeiter reicherten das Medium 1950 mit Pankreatin und Tween 80 an (58).

BRAUN fügte 1959 zusätzliche Komponenten wie β -Ethyl-N-Acetylglukosamin hinzu (58).

MAYER ersetzte 1964 Zystein durch Zystin (58).

YOSHIKA erniedrigte den Gehalt an Natriumazetat und erhöhte den Caseinzusatz (58).

HASSINEN und Mitarbeiter stellten 1951 den ersten vollsynthetischen Nährboden für Bifidobakterien her. Er enthielt Zystin, Biotin, Kalziumpantothenat, Ascorbinsäure und verschiedene Salze (58).

GYLLENBERG und NIEMELÄ modifizierten diesen Nährboden 1959 für die Zählung von Bifidobakterien des Typs B₁ nach DEHNERT. Statt Laktose wurde Arabinose verwendet; Riboflavin, Pantothin und Tween 80 kamen als neue Komponenten hinzu (91).

EVANS und NIVEN entwickelten 1951 einen Nährboden für Laktobazillen, die eine Grünfärbung von Fleischprodukten bewirken, auf der Basis von Hefeextrakt, Caseinpepton, Tween 80 und verschiedenen Mineralsalzen. Mit dem Zusatz von Thiaminhydrochlorid wird dieses APT-Medium (All Purpose Media with Tween) heute zur Prüfung von vergrünenden Milchsäurebakterien besonders auf geräucherter Wurst empfohlen und ist als Fertignährboden erhältlich (28).

ROGOSA, MITCHELL und WISEMAN erprobten 1951 einen Nährboden für die Kultur von oralen, faekalen und vaginalen Laktobazillen, der bessere selektive Eigenschaften als der Tomatensaftagar haben sollte. Die Koloniezahl erwies sich auf beiden Medien als gleich hoch, das Wachstum der Begleitflora war jedoch auf dem neu entwickelten Nährboden wesentlich herabgesetzt, ob allerdings bei den Versuchen zwischen Laktobazillen und Bifidobakterien differenziert wurde, läßt sich aus der Literatur nicht ersehen (66). Der beschriebene Nährboden ist als Rogosa-Agar oder BBL-Laktobazillen-Selektivagar im Handel.

SHIMADA und Mitarbeiter verwendeten 1977 einen modifizierten Rogosa Agar zur Zählung von Bifidobakterien in fermentierten Milchprodukten. Sie verwendeten einen Nährboden, der zusätz-

lich Natriumpropionat, Paromomycinsulfat, Neomycinsulfat und Lithiumchlorid enthielt (58).

HACKENTHAL und BIERKOWSKI entwickelten 1951 einen Nährboden für die Differenzierung von Streptokokken. Er enthielt Pferdefleischinfus, Hammelblut, Pepton, Natriumchlorid und Glukose; als Indikator diente Wasserblau. Der pH Wert lag im leicht alkalischen Bereich, bei pH 7,5. Der Nährboden wird auch als geeignet für Bifidobakterien bezeichnet. Durch den Indikator lassen sich die Kolonien aufgrund ihrer Farbe identifizieren; Bifidobakterien erscheinen braun (58).

COX und BRIGGS führten 1953 Versuche zur Verbesserung der Nährmedien für Laktobazillen durch. Die Kombinationen 0,1 % Tween 80 und 0,6 % Hefeextrakt bzw. 0,1 % Tween 80, 0,6 % Hefeextrakt und 0,05 % lösliche Stärke erwiesen sich als optimale Wuchsstoffe (17,20).

PETUELY entwickelte 1955 einen vollsynthetischen Nährboden für die Anzucht von Bifidobakterien aus dem Stuhl. Der Nährboden enthielt Laktose, Tween 80 und die verschiedensten Salze und Vitamine. Bifidobakterien traten in drei verschiedenen Formen auf:

- nach 48 Stunden bis zu 5 mm anwachsende , glänzende, porzellanweiße Kolonien, die mikroskopisch als unverzweigte Stäbchen erscheinen,
- nach 48 Stunden bis 4 mm wachsende Kolonien mit matter Oberfläche, mikroskopisch ebenfalls unverzweigte Stäbchen,
- nach 48 Stunden bis 1-1,5 mm große Kolonien, scharf begrenzt und durchscheinend, mikroskopisch kleiner, mit Polkörperchenstruktur , teilweise gekammert (57).

GYLLENBERG und CARLBERG modifizierten das Petuely Medium 1958 durch Zusatz von N-Azetylglukosamin und verwendeten es zur Untersuchung von Bifidobakterien aus Säuglingsstühlen.

TANAKA und MUTAI gaben 1980 eine neue Variante des Nährbodens an. Durch die Zugabe von Riboflavin, Nukleinsäurebasen, Bernsteinsäure und Nalidixinsäure konnten sie die quantitative Ausbeute erhöhen und eine größere Selektivität für Bifidobakterien erreichen. Der Nährboden eignete sich auch für die Zählung (76).

RAYNAUD entwickelte 1959 für die Kultur des originalen TISSIER Stammes ein Nährmedium auf der Basis von Fleisch- und Hefeextrakt, das außerdem Pepton, Zysteinhydrochlorid, Natriumchlorid und Glukose enthielt. Dieses Medium fand in verschiedenen Varianten für die Kultur von Bifidobakterien Verwendung; es wurde Pferde- oder Schafsblut dazugegeben. Mit Glukose- und Glykocholatzusatz wurde es für Studien über den Abbau von Gallensalzen verwendet(58).

OCHI beschrieb 1964 ein Nährmedium für Bifidobakterien sehr komplizierter Zusammensetzung auf der Basis von Glukose, Blut, Leber, Hefeextrakt und Fleischextrakt, das mit Salzen, Peptonen und Tween 80. angereichert war (58).

Spätere Modifikationen (TERAGUCHI 1978) enthalten im Gegensatz zur ursprünglichen Version kein Pferdeblut mehr (58).

SHIMADA empfahl das Medium 1977 für die Kultur von Bifidobakterien aus fermentierten Milchprodukten (58). Die Identifizierung der Bifidobakterien erfolgt aufgrund ihrer Koloniform, Farbe und Geruch. Zur Zählung von Bifidobakterien aus Milchprodukten wird dem Agar kein Blut beigemischt, sondern eine Lösung von Neomycinsulfat, Paromomycinsulfat, Nalidixinsäure und Lithiumchlorid dazugegeben; womit die Selektivität verbessert werden soll (58).

REUTER beschrieb 1968 einen Nährboden für Laktobazillen, der 0,4 % Sorbinsäure enthielt und bei 50° C auf pH 5,0 eingestellt wurde. Mit diesem Medium erreichte der Autor eine bessere Selektivität für den Nachweis von Laktobazillen aus

Fleischprodukten, wo sie neben Enterokokken, Pediokokken und Leuconostoc nachzuweisen waren. Durch Mangan- und Magnesiumsalze wird das Wachstum der Laktobazillen besonders gefördert. Der Sorbinsäureagar ist in der von REUTER beschriebenen Zusammensetzung im Handel (62).

HAENEL entwickelte 1970 einen Nährboden für die Typisierung und Zählung von Bifidobakterien. Es wurde die Vergärung von Glukose, Laktose, Arabinose, Xylose, Zellobiose, Sorbit, Melizitose und Salizin geprüft; die verwendeten Indikatoren waren Neutralrot und Bromkresolgrün (33).

LAUER und KANDLER entwickelten 1976 einen Nährboden für die Zählung von Bifidobakterien in fermentierten Milchprodukten. Das Medium enthielt Fleisch- und Hefeextrakt, Caseinpepton, Glukose, ferner Ascorbinsäure, Zysteinhydrochlorid, Phosphatsalze und Tween 80 (42).

TROVATELLI und MATEUZZI verwendeten 1976 für die Isolierung von Bifidobakterien aus dem Pansen ein Medium, das aus Hefeextrakt, Glukose und Peptonen, sowie Mineralsalzen bestand. Zur Abgrenzung von Laktobazillen wurde auf das Enzym Fruktose-6-Phosphat-Phosphoketolase getestet (80).

YOKOYAMA und Mitarbeiter benutzten 1977 für die Isolierung eines Skatol bildenden Laktobazillenstammes ein Medium, das neben Glukose, Peptonen, Mineralsalzen und Hefeextrakt Pansenflüssigkeit enthielt. Als Reduktionsmittel wurden wechselweise Zystein und Ascorbinsäure eingesetzt, in beiden Fällen waren die Ergebnisse zufriedenstellend (87).

KOTARSKI und SAVAGE verwendeten 1979 ein Nährmedium zur Kultur von Laktobazillen, das als Kohlenhydrat Saccharose enthielt. Den Nährboden nannten die Autoren PYST Medium (Peptone, Yeast Extract, Saccharose, Tween) (39).

RESNICK und LEVIN entwickelten 1981 einen Selektivnährboden

für die Zählung von Bifidobakterien aus Wasser. Das Medium enthielt als Kohlenhydrat Laktose; damit sollten die humanen Stämme in ihrem Wuchs gefördert werden. Als Hemmstoffe wurden Neomycinsulfat und Nalidixinsäure eingesetzt; Bromkresolgrün diente als Hemmstoff und Indikator. Wird Laktose fermentiert, so erscheinen die Kolonien grün gegenüber einem blauen Filter (59).

5.2. Bestandteile der Nährböden für Bifidobakterien und Laktobazillen

5.2.1. Stickstoffquellen

Die Nährböden für Bifidobakterien und Laktobazillen enthalten als Stickstoffquellen vorwiegend Peptone unterschiedlicher Herkunft und Herstellungsweise. Oft werden auch native Proteine verwendet; doch neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Peptone den nativen Proteinen in den nutritiven Eigenschaften überlegen sind (4). Als komplexe Stickstoffquelle wird häufig Fleischextrakt eingesetzt.

Verschiedene Medien enthalten definierte Stickstoffverbindungen wie Aminosäuren und anorganische Ammoniumsalze. Die Bifidobakterien können teilweise Ammoniumsalze als alleinige Stickstoffquelle nutzen; dagegen benötigen die Laktobazillen immer organische Verbindungen, mindestens also Aminosäuren. Die Aminosäure Zystein wird den Nährböden aber meist nur zur Senkung des Redoxpotentials zugefügt (41).

Die als Stickstoffquellen gebrauchten Stoffe sind in Tab.5 zusammengestellt.

5.2.2. Kohlenstoffquellen

Als Kohlenstoffquellen enthalten die Nährböden Glukose, Laktose oder Saccharose, Polysaccharide wie Stärke und Dextrin, den Aminozucker N-Acetylglukosamin oder den Zuckeralkohol Inositol. Der Tomatensaft stellt eine komplexe Kohlenstoffquelle, insbesondere für Hexosen, dar. Geringe Mengen von Oligo- und Polysacchariden finden sich auch in verschiedenen Peptonen.

5.2.3. Wachsfaktoren

Nährböden für Bifidobakterien und Laktobazillen enthalten

Stoffe sehr unterschiedlicher Art, die das Wachstum der Bakterien fördern. Das sind Vitamine der B-Gruppe, entweder als Einzelsubstanzen oder in Form von Hefe- oder Organextrakten. So dient Rindermilz als Quelle für Vitamin B₁₂ (88). Andere Wuchsstoffe sind oberflächenaktive Substanzen wie Tween 80 oder auch Tween 40 in Kombination mit Ölsäure; sie stellen ungesättigte Fettsäuren bereit. Als spezielle Wachsfaktoren für Laktobazillen werden Mangan- und Magnesiumsalze eingesetzt. N-Azetylglukosaminhaltige Saccharide und Peptone fördern das Wachstum der Bifidobakterien. Ein weiterer häufig verwendeter Wuchsstoff ist p-Aminobenzoesäure. Auch dem Tomatensaft werden wuchsfördernde Eigenschaften zugeschrieben (40).

Die in den Nährböden für Bifidobakterien und Laktobazillen verwendeten Wuchsstoffe sind in Tab.7 zusammengestellt.

5.2.4. Zusätze zur Senkung des Redoxpotentials der Nährböden

Die Senkung des Redoxpotentials der Nährmedien fördert die Vermehrung anaerober Bakterien. Diesem Zweck dienen Zusätze von reduzierenden Substanzen wie Ascorbinsäure, Natriumthioglykolat, Zystein und komplexe Additive wie Leberextrakt. Der Leberextrakt enthält sowohl Zystein als auch verschiedene Wachsfaktoren.

Die Zusätze, die der Erniedrigung des Redoxpotentials dienen, sind in Tab. 6 zusammengestellt.

5.2.5. Indikatoren

Farbstoffindikatoren werden den Nährböden zugesetzt, um die Bifidobakterien und Laktobazillen anhand von charakteristischen Koloniefärbungen erkennbar zu machen. Häufig verwendete Indikatoren sind Anilinblau, Bromkresolgrün, Bromkresolpurpur, Berliner Blau und Triphenyltetrazoliumchlorid.

5.2.6. Puffersubstanzen

Der pH Wert der Nährböden wird im allgemeinen mit Puffermischungen aus Phosphat- und Karbonatsalzen eingestellt.

5.2.7. Hemmstoffe

Die Zugabe von Hemmstoffen dient der Unterdrückung der Begleitflora in Proben mit einer Mischflora aus verschiedenartigen Mikroorganismen. Als Hemmstoffe werden bevorzugt Antibiotika mit selektivem antimikrobiellen Spektrum, meist Aminoglykoside wie Neomycin oder Chinolinderivate wie Nalidixinsäure verwendet. Da die Senkung des pH Wertes ebenfalls selektiv wirkt, werden einigen Nährböden auch Säuren, meist Sorbinsäure oder Essigsäure, zugesetzt. Als Hemmstoffe werden ferner Natriumazid, Natriumpropionat und Lithiumchlorid eingesetzt.

Die in den Nährböden für Bifidobakterien und Laktobazillen enthaltenen Hemmstoffe sind in Tab. 8 dargestellt.

Tab.5

Zusammensetzung von Peptonen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Trypcase, Trypton, Caseinpepton, Trypticase	tryptisch verdautes Casein
Casein Digest, Casiton	pankreatisch verdautes Casein
Tryptose	verschiedene tryptisch aufgeschlossene Proteine
Vitaminfreie Casamino-säuren	durch Säure hydrolysiertes Casein
Universalpepton, Proteosepepton Neopepton, Polypepton Pepton	Mischpeptone, aus Casein, Fleisch Soja, Gelatine; peptisch, papainisch oder pankreatisch verdaut
Phyton	papainisch abgebautes Sojamehl

Tab.6

Zusätze zu Erniedrigung des Redoxpotential

Askorbinsäure	Zystein-HCl
Kalziumsulfid, Natriumsulfid	Glutathion
Natriumthioglykolat	Organextrakte

Tab.7

Wuchsstoffe für Bifidobakterien und Laktobazillen

Tween 80	Tween 40 und Ölsäure
Pantethin	p-Aminobenzoessäure
N-Acetylglukosaminhaltige	Glykoproteine und Glykopeptide
Saccharide	
Peptone	Hefeextrakt
Tomatenextrakte	Manganchlorid, Mangansulfat
Magnesiumsulfat	Pansenflüssigkeit

Tab.8

Hemmstoffe für die selektive Züchtung von Bifidobakterien und Laktobazillen

Neomycin	Kanamycin
Paromomycin	Nalidixinsäure
Sorbinsäure	Essigsäure
Natriumazid	Natriumpropionat
Lithiumchlorid	

5.3. Auswahl der Nährböden

Aus der Gesamtzahl der bekannten Rezepturen wurde eine begrenzte Zahl von Nährböden mit charakteristischer Zusammensetzung ausgewählt.

5.3.1. Standardnährböden

Tomatensaft-Agar (Difco)

Milch-Agar (Oxoid)

Eugon-Agar (BBL)

APT-Agar (Merck)

Leber-Zystin-Milchzucker-Agar nach BLAUROCK

Trypticase-Phyton-Glukose-Agar nach ATCC (TPG)

Glukose-Leber-Agar nach OCHI modifiziert nach TERAGUCHI

Pepton-Hefeextrakt-Saccharose-Tween Agar nach KOTARSKI
und SAVAGE (PYST)

Fleisch-Hefe-Agar nach BEERENS (VL)

Die Auswahl umfaßt nur feste Medien; von Nährmedien ähnlicher Zusammensetzung wurde jeweils ein Prototyp untersucht, wobei im Handel als Trockennährböden erhältliche Medien bevorzugt wurden. Einige Nährböden wurden wegen Schwierigkeiten bei der Herstellung aus dieser Studie ausgeschlossen. Beim PYG-RF Medium bereitet die Herstellung und Standardisierung der gereinigten Pansenflüssigkeit Schwierigkeiten. Das gilt auch für die Rindermilz im Medium für glatte Kolonieoberflächen nach ROGOSA und MITCHELL; zudem ähnelt das Medium hinsichtlich der Reichhaltigkeit seiner Wachstoffsstoffe dem Petuely Medium. Molke-Agar (Oxoid) ist außer Handel.

5.3.2. Selektivnährböden

Rogosa-Agar (Merck)

Sorbinsäure-Agar (Merck)

Medium nach PETUELY modifiziert nach TANAKA und MUTAI
YN 6-Medium nach RESNICK und LEVIN

Petuely- und YN 6-Agar enthalten Antibiotika bzw Chemotherapeutika als Selektivstoffe. Sie wurden ausgewählt, weil sie zur besseren Differenzierung zusätzlich Indikatoren enthalten. Beim Rogosa-Agar und beim Sorbinsäureagar wirken Säuren als Selektivstoff. Der Rogosa-Agar wird in seiner ursprünglichen Rezeptur verwendet, um die selektive Wirkung des Eisessigs zu untersuchen.

Die Natriumazid enthaltenden Medien wurden weggelassen, da neuere Untersuchungen gezeigt haben, daß Laktobazillen im neutralen Bereich durch Natriumazid größtenteils gehemmt werden, so daß für Bifidobakterien ähnliche Ergebnisse zu erwarten sind (11). Auch bei den üblichen Antibiotikazusätzen ist mit einer Wachstumshemmung für einige Stämme zu rechnen (14).

Modifikationen des Agars nach OCHI und TERAGUCHI durch Selektivstoffe wurden nicht untersucht, da der Nährboden aufgrund seiner aufwendigen Herstellung für die praktische Anwendung kaum geeignet ist.

5.4. Herstellungsvorschriften für die verwendeten Nährböden

5.4.1. Fertignährböden - Vergleich mit den Originalrezepten

In der vorliegenden Studie wurden die Fertignährböden verwendet; darum wird in diesem Abschnitt auf die ausführliche Darstellung verzichtet. Alle Angaben beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf 1 l Nährboden.

5.4.1.1. APT-Agar (All purpose media with Tween, Merck 10454)

	Original (28)	Merck
Caseinpepton	10,0	12,5
Hefeextrakt	5,0	7,5
Glukose	10,0	10,0
Natriumchlorid	5,0	5,0
Tri-Natriumcitrat	5,0	5,0
Dikaliumhydrogenphosphat	5,0	5,0
Magnesiumsulfat	0,8	0,8
Manganchlorid	0,14	0,14
Eisen(II)sulfat	0,04	0,04
Tween 80	1,0	0,2
Thiaminchlorid		0,001
Agar	15,0	13,5

Die vorgeschriebene Pulvermenge wird gelöst und 10 Minuten bei 121°C sterilisiert. Der pH beträgt $6,7 \pm 0,1$.

5.4.1.2. Eugon-Agar (bio Mérieux 51341 , BBL 11230)

	Original (81)	bio Mérieux	BBL
Trypcase	20,0	15,0	15,0
Soyase	20,0	5,0	5,0
Glukose	12,0	5,5	5,5
Natriumchlorid	2,0	4,0	4,0
Natriumsulfit	0,5	0,2	0,2

l-Zystin	10,0	0,7	0,7
Agar		15,0	15,0

5.4.1.3. Rogosa-Agar (Merck 5413, Oxoid CM 627, BBL 11327)

	Original (62)
Caseinpepton	10,0
Hefeextrakt	5,0
Glukose	20,0
Kaliumdihydrogenphosphat	6,0
Ammoniumcitrat	2,0
Natriumacetat	6,25
Magnesiumsulfat	0,575
Eisen(II)sulfat	0,034
Mangansulfat	0,12
Tween 80	1,0
Eisessig	1,32 ml
Agar	15,0

Die handelsüblichen Nährböden weisen gegenüber der Originalzusammensetzung abweichende Anteile an Natriumazetat und an Agar auf.

Die vorgeschriebene Pulvermenge wird gelöst, mit etwa 1,3 ml 96 % iger Essigsäure erfolgt die Einstellung der Lösung auf pH 5,5. Der Nährboden wird nicht autoklaviert.

5.4.1.4. Sorbinsäure-Agar (Merck 10451)

	Original (62)
Caseinpepton	10,0
Fleischextrakt	10,0
Hefeextrakt	5,0
Glukose	20,0

Natriumazetat	5,0
Natriumziträt	3,0
Magnesiumsulfat	0,2
Mangansulfat	0,05
Tween 80	1,0
Sorbinsäure	0,4
Agar	20,0

Die vorgeschriebene Menge an Trockensubstanz wird heiß gelöst, die Lösung auf etwa 50°C abgekühlt und 0,4 g / l Sorbinsäure als wässrige Lösung dazugegeben. Der Nährboden wird 30 Minuten lang bei 100°C sterilisiert. Der pH soll $5 \pm 0,1$ betragen.

Der Sorbinsäure Agar Merck 10451 ist in der Zusammensetzung identisch mit der Originalvorschrift.

5.4.1.5. Tomatensaft-Agar (Oxoid CM 113, Pasteur 58, Difco B 31, Difco B 389, BBL 11739)

	Original (40)	Oxoid Pasteur	Difco B 31 BBL	Difco B389
Tomatensaft	wechselnd	20,0	20,0	20,0
Pepton	5,0 -10,0	10,0	10,0	10,0
Peptonisierte Milch		10,0	10,0	10,0
Agar	10,0	12,0	11,0	20,0

Die jeweils vorgeschriebene Substanzmenge wird unter Erwärmen gelöst und 15 Minuten bei 121°C sterilisiert.

Die Nährböden unterscheiden sich durch die unterschiedlichen Peptonkomponenten, die von den Firmen eingesetzt werden. Fa. BBL stellt auf pH 6,1 ein, Fa. Pasteur (wie in der Originalvorschrift) auf pH 7,0. Bei Difco B 31 beträgt der pH 6,1; bei Difco B 389 liegt der Wert bei 5,0.

5.4.1.6. Milch-Agar (Oxoid CM 21)

Pepton	5,0	
Hefeextrakt	3,0	
Feste Milchbestandteile	1,0	entspricht 10 ml Milch
Agar	15,0	

5.4.2. Herstellungsvorschriften für die nicht im Handel verfügbaren Nährböden

5.4.2.1. Pepton-Hefeextrakt-Saccharose-Tween-Medium nach KOTARSKI und SAVAGE , PYST (39)

Pepton (Difco)	10,0
Hefeextrakt (Difco)	10,0
Saccharose	10,0
Tween 80	10,0
Agar (Difco)	7,0

Zur Herstellung des Nährbodens liegen in der Literatur keine weiteren Angaben vor.

5.4.2.2. YN 6-Medium nach RESNICK und LEVIN (59)

Polypepton Pepton	10,0
Casamminosäuren (Difco)	8,0
Hefeextrakt	20,0
Natriumchlorid	3,2
Bromkresolgrün	0,3
Aqua dest.	ad 1000,0 ml

Die Substanzen werden gelöst und 10 Minuten gekocht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur gibt man dazu:

Zystein-HCl	0,4
Nalidixinsäure	0,08

Der pH Wert wird mit 10 N Natronlauge auf 6,9 eingestellt. Anschließend fügt man 15 g Agar hinzu und sterilisiert 15 Minuten bei 121°C. Nach dem Abkühlen auf 60°C wird 1 ml einer Neomycinlösung (2,5 mg/ml) dazugegeben. Die Aufbewahrung des Nährbodens erfolgt bei 4°C unter Lichtschutz. Die Haltbarkeit beträgt sieben Tage.

Die Autoren empfehlen eine 48 stündige Bebrütung bei 37°C unter anaeroben Bedingungen.

5.4.2.3. Leber-Zystin-Milchzucker-Agar nach BLAUROCK (15)

Pepton (Difco)	10,0
Laktose	10,0
Frischer Leberinfus	1000,0 ml
Natriumchlorid	5,0
Zystin	0,1
Agar	20,0

In der Originalvorschrift werden 500 g Rinderleber und 100 ml Wasser zwei Stunden lang gekocht, filtriert und zu 1000 ml verdünnt; auf diese Weise erhält man den Leberinfus. Bei den Untersuchungen in der vorliegenden Studie wurden stattdessen 2,5 g Leberpulver in 1000 ml Wasser gelöst.

Der Nährboden wird bei 108 - 109°C 30 Minuten lang sterilisiert und ist maximal 7 - 10 Tage haltbar.

Durch Zugabe von 1,2 % Sorbinsäure, die vorher auf pH 6,4 neutralisiert wurde, läßt sich die Selektivität des Mediums erhöhen; für die Isolierung von Bifidobakterien wird der Zystingehalt auf 2,5 - 10 mg/l gesenkt (58).

Der pH des fertigen Nährbodens beträgt 7,4.

Lösung A:

Kaliumdihydrogenphosphat	25,0
Kaliummonohydrogenphosphat	25,0
in 250 ml destilliertem Wasser	

Lösung B:

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	10,0
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,337
Natriumchlorid	0,5
in 250 ml destilliertem Wasser	

Die Leberextraktlösung wird im Originalrezept aus 10 g Leberpulver (Kyokuto) hergestellt. Dieses wird mit 170 ml Wasser eine Stunde lang bei 50 - 60°C extrahiert, zehn Minuten gekocht und filtriert.

Alle Zutaten außer Zystein-HCl werden in Wasser gelöst, der pH Wert wird auf 7,2 eingestellt. Die Sterilisation erfolgt 10 Minuten bei 120°C. Nach dem Abkühlen auf 50°C gibt man das Zystein in Form einer 5 % igen Lösung zu.

Das ursprüngliche Rezept nach OCHI enthält zusätzlich 50 ml Pferdeblut, das nach dem Sterilisieren und Abkühlen auf 50°C dazugegeben wird.

Für die Zählung von Bifidobakterien aus Milchprodukten wandelten TERAGUCHI und Mitarbeiter den Nährboden durch folgenden Zusatz ab (77):

Lithiumchlorid	30,0
Nalidixinsäure	0,1
Neomycinsulfat	0,4
Paromomycinsulfat	6,0

5.4.2.4. Tryptikase-Phyton-Glukose-Medium nach ATCC (58)

Tryptikase (BBL)	10,0
Phyton (BBL)	5,0
Hefeextrakt	2,5
Glukose	15,0
Kaliummonohydrogenphosphat	2,0
Zinksulfat	0,25
Magnesiumchlorid	0,5
Eisen(III)chlorid	Spuren
Zystein	0,5
Agar	8,0

Eisen(III)chlorid und Zinksulfat werden gesondert in Wasser gelöst und zum restlichen Medium dazugegeben.

Um das Wachstum von *B. magnum* und *B. pullorum* zu verbessern, kann der Nährboden durch Zugabe von 2 ml Tween 80 pro Liter Medium modifiziert werden.

5.4.2.5. Glukose-Leber-Agar nach OCHI (58)

Tryptikase	5,0
Proteose Pepton Nr. 3 (Difco)	10,0
Phyton (BBL)	3,0
Hefeextrakt (Difco)	5,0
Leberextraktlösung	150,0 ml
Lab Lemco	3,0
Glukose	10,0
Lösliche Stärke	0,5
Tween 80	1,0
L-Zystein-HCl	0,5
Lösung A	10,0 ml
Lösung B	5,0 ml
Agar	15,0
Aqua dest.	815,0 ml

Der pH des fertigen Nährbodens beträgt 7,2.

Ein anderer selektiver Zusatz ist folgendermaßen herzustellen:

Natriumpropionat	30,0
Paromomycinsulfat	0,1
Neomycinsulfat	0,4
Lithiumchlorid	6,0

Natriumpropionat wird in 90 ml Wasser gelöst. Anschließend gibt man die restlichen Substanzen dazu und füllt mit Wasser auf 100 ml auf. Zu 1 l Nährmedium werden 50 ml dieser Lösung gegeben.

Die gleiche Lösung wird auch als selektiver Zusatz für den Rogosa Agar empfohlen (58).

5.4.2.6. Petuely-Medium (57)

Laktose	70,0
Kaliummonohydrogenphosphat	5,0
Ammoniumacetat	4,0
Tween 80	2,0
Zystin	0,4
Magnesiumsulfat	0,25
Eisen(II)sulfat	0,0125
Mangansulfat	0,0085
Natriumchlorid	0,0125
Kalziumpantothenat	800,0 µg
Biotin	8,0 µg
Askorbinsäure	20,0 µg

Die Substanzen werden in Wasser gelöst und sterilfiltriert. Eine 4 % ige sterile Agarlösung wird bei einer Temperatur von höchstens 60°C mit dem gleichen Volumen der gleichwarmen Nährlösung vermischt und davon Platten gegossen. Die Platten müssen nach dem Gießen entweder sofort verwendet werden oder

in einem Exsikkator über Kohlendioxid aufbewahrt werden. Ursachen für eine Gelbfärbung kann zu hohe Temperatur oder zu langes Stehen an der Luft sein. Die Bebrütung soll in einem mit Kohlendioxid gefüllten Vakuumexsikkator im Brutschrank bei 37°C über 48 Stunden vorgenommen werden. Der pH des Nährbodens beträgt 6,4.

CARLBERG und GYLLENBERG (32) modifizierten das Medium durch Zugabe von 20 mg N-Acetylglukosamin pro 100 ml Medium.

Die Modifikation nach TANAKA und MUTAI (76) weicht stark von der ursprünglichen Zusammensetzung ab und wird deshalb gesondert aufgeführt:

Laktose	20,0
Ammoniumsulfat	5,0
Kaliummonohydrogenphosphat	1,0
Salzlösung	5,0 ml
Resazurin 0,1 % ige Lösung	1,0 ml
Pantothensäure	0,002
Biotin	0,1
Riboflavin	0,001
Adenin	0,001
Guanin	0,001
Xanthin	0,001
Urazil	0,001
Tween 80	1,0
Brenztraubensäure 10 % ige Lösung	1,0 ml
Natriumkarbonat 8 % ige Lösung	50,0 ml
Zystein-HCl 3 % ige Lösung	10,0 ml
Nalidixinsäure	0,1
Bromkresolpurpur 1,6 % ige Lösung	1,0 ml
Agar	20,0

Salzlösung:

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	10,0
--	------

Natriumthioglykolat	1,0
Tween 80	1,0
Adenin	0,01
Guanin	0,01
Xanthin	0,01
Urazil	0,01
Natriumformaldehydsulfoxylat	0,125
Lösung 1	200,0 ml
Salzlösung	10,0 ml
Vitaminlösung	10,0 ml
Agar	20,0

Salzlösung:

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	11,5
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	2,4
$\text{FeSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,68
Aqua dest.	ad 100,0 ml

Lösung 1, Angaben in mg/ml:

Säurehydrolysiertes Casein	50,0
DL-Asparaginase	2,5
DL-Tryptophan	1,0
L-Zystin	1,0
Natriumazetat	165,0
Kaliummonohydrogenphosphat	60,0
Diammoniumzitrat	20,0

Vitaminlösung:

Nikotinsäure	0,04
Thiamin-HCl	0,02
Kalziumpantothenat	0,02
Pyridoxamin-di-HCl	0,008
Riboflavin	0,02

FeSO ₄ .7 H ₂ O	0,5
MnSO ₄ .2 H ₂ O	0,4
Natriumchlorid	0,5
in 250 ml destilliertem Wasser	

Der pH des fertigen Mediums beträgt 6,8. Zur Sterilisation wird das Medium 30 Minuten lang auf 100°C erhitzt und bis zur Verwendung bei 5°C gelagert. Die Bebrütung nahmen die Autoren nach dem Hungate-Verfahren 24 -48 Stunden lang bei 37°C vor.

5.4.2.7. Fleisch-Hefe-Agar nach BEERENS , VL (10)

Trypton	10,0
Fleischextrakt	3,0
Hefeextrakt	6,0
Glukose	2,0
Natriumchlorid	5,0
Zystein-HCl	0,3
Agar	18,0

Der pH des Nährbodens beträgt 7,4 - 7,5. Eine genaue Herstellungsvorschrift ist nicht angegeben.

Modifikationen sind durch Zugabe von Blut, verschiedenen Extrakten, Kanamycin, sowie durch Mengenvarianten möglich (58).

5.4.2.8. Medium nach ROGOSA und MITCHELL für glatte Kolonieoberflächen (65)

Dieser Nährboden wurde nicht in die praktischen Versuche einbezogen.

Tryptikase	2,5
Rindermilz	2,5
Glukose	20,0

Pyridoxal-HCl	0,004
Pyridoxin	0,008
Inositol	0,4
Cholin	0,4
p-Aminobenzoesäure	0,004
Biotin	0,2
Folsäure	0,2
in 200 ml destilliertem Wasser	

Die Kulturen wurden 48 bis 72 Stunden bei 37°C inkubiert.

5.4.2.9. Pepton-Hefeextrakt-Glukose-Pansenflüssigkeit-Medium, PYG-RF nach YOKOYAMA und Mitarbeitern (87)

Dieser Nährboden wurde nicht in die praktischen Versuche einbezogen.

Pepton	5,0
Hefeextrakt	3,0
Glukose	5,0
Gereinigte Pansenflüssigkeit	200,0 ml
Kaliummonohydrogenphosphat 0,6 % ige Lösung	83,0 ml
Natriumkarbonat 8 % ige Lösung	50,0 ml
Hemin-Menadionlösung	10,0 ml
Minerallösung	83,0 ml
Zysteinsulfid 2,5 % ige Lösung	20,0 ml
Resazurin 0,1 % ige Lösung	1,0 ml
Agar	20,0

Minerallösung:

Kaliumdihydrogenphosphat	0,6
Ammoniumsulfat	0,6
Natriumchlorid	1,2
Magnesiumsulfat	0,245
Kalziumchlorid	0,159
in 100 ml destilliertem Wasser.	

Die Hemin-Menadionlösung wird nach Anaerobe Laboratory Manual (2) hergestellt.

Alle Zutaten außer Zystein und Natriumkarbonat werden zusammengegeben, der pH wird mit 1 N Natronlauge auf 6,5 eingestellt. Die Sterilisation erfolgt 20 Minuten bei 121°C. Anschließend wird die aseptisch zubereitete Karbonat- und Zysteinlösung dazugegeben.

Der Nährboden wird unter Kohlendioxid aufbewahrt.

Tab. 9.

Zusammensetzung von Nährböden für die nichtselektive und selektive Züchtung von Bifidobakterien und Laktobazillen

a) Handelsübliche Nährböden

Nährmedium	Grundstoffe	Kohlenhydrate	Wuchsstoffe	Hemmstoffe	Indikatoren und andere
APT-Agar (28) Merck 10454	Caseinpepton	Glukose	Hefeextrakt Magnesiumsulfat Manganchlorid		
Eugon-Agar (81) BBL 11230	Trypcase Soyase	Glukose			L-Zystin
MRS-Agar (44) z.B. Merck 10661	Pepton Fleischextrakt	Glukose	Hefeextrakt Magnesiumsulfat Mangansulfat Tween 80		
Rogosa-Agar (62) z.B. Oxoid CM 627	Caseinpepton	Glukose	Hefeextrakt Magnesiumsulfat Mangansulfat Tween 80	Eisessig 1300	

Zusätze in mg/l

Nährmedium	Grundstoffe	Kohlenhydrate	Wuchsstoffe	Hemmstoffe	Indikatoren und andere
Modifikation (58)				Paromomyc.50 Neomyc. 200 Lithiumchl.3000 Na-Propion.15000	
Sorbinsäureagar (62) Merck 10451	Caseinpepton Fleischextrakt	Glukose	Hefeextrakt Tween 80 Magnesiumsulfat Mangansulfat	Sorbinsäure 400	
Caseinpepton-Hefeextrakt-Dextrose-Agar z.B. Oxoid CM 325	Caseinpepton	Glukose	Hefeextrakt		
Milch-Agar Oxoid CM 21	Peptone , feste Milchbestandteile		Hefeextrakt		
Molke-Agar Oxoid CM 125	Molke Fleischpepton				

Zusätze in mg/l

Nährmedium	Grundstoffe	Kohlenhydrate	Wuchsstoffe	Hemmstoffe	Indikatoren und andere
Trypsin-Digest-Agar Difco B 30	Tryptisch verdaute Milch, Pepton	Glukose Dextrin	Tomatensaft		
Clostridien-Agar z.B. Merck 5410	Fleischextrakt Caseinpepton	Glukose Stärke	Hefeextrakt		L-Zystein-HCl
Anaerobier-Agar BBL 10926	Tryptikase Phyton	Glukose	Hefeextrakt		L-Zystin Na-thioglykolat ,
Hirn-Herz-Dextrose- Agar, Difco B 418	Kalbshirninfus Rinderherzinfus Proteose Pepton	Glukose			
Columbia-Agar-Base Oxoid CM 331	Pepton	Stärke			
Modifikation				Neomycin 1000	

Zusätze in mg/l

b) Nicht im Handel verfügbare Nährböden

Nährmedium	Grundstoffe	Kohlenhydrate	Wuchsstoffe	Hemmstoffe	Indikatoren und andere
Medium f. weiche Oberflächen (65)	Casein Tryptikase	Glukose Inositol	Magnesiumsulfat Mangansulfat Tween 80 p-Aminobenzoessre		L-Zystin Rindermilz Na-thioglykolat
Medium nach Tomarelli (79)	Casein	Glukose	Magnesiumsulfat Mangansulfat p-Aminobenzoessre		Zystin Askorbinsäure
YN 6-Agar (59)	Polypepton Pepton vitaminfreie Cas-aminosäuren		Hefeextrakt	Nalidixinsre 80 Neomycin 2,5	
Petueley-Agar (57)	Pepton	Laktose	Magnesiumsulfat Mangansulfat Tween 80		Zystin Askorbinsäure
Modifikation (27)			N-Azetylglukosamin		

Zusätze in mg/l

Nährmedium	Grundstoffe	Kohlenhydrate	Wuchsstoffe	Hemmstoffe	Indikatoren und andere
Modifikation (76)					
Agar nach Blaurock (15,16)	Pepton Difco	Laktose	Magnesiumsulfat Tween 80 Bernsteinsäure	Nalidixinsre 100	Zystein Bromkresol- purpur
Modifikation (58)				Sorbinsre 12000	Leberinfus Zystin
VL Agar nach Bee-rens (58)	Trypton Fleischextrakt	Glukose	Hefeextrakt		Zystein-HCl
Modifikation				Kanamycin *	
Medium nach Orla-Jensen (58)	Caseinpepton	Glukose	Tomatenpüree Hefeautolysat Tween 80		Zystein oder Ascorbinsäure
Modifikation			Tween 80		
Modifikation				Natriumazid 100	

* Mengenangabe fehlt

Zusätze in mg/l

Nährmedium	Grundstoffe	Kohlenhydrate	Wuchsstoffe	Hemmstoffe	Indikatoren und andere
Modifikation					
Nährboden nach Ochi (58)	Proteose Pepton Tryptikase Lab Lemco	Glukose Stärke	Hefeextrakt Magnesiumsulfat Mangansulfat Tween 80	Sorbinsäure 400	L-Zystein-HCl Leberextrakt
Modifikation (77)				Lithiumchl. 3000 Nalidixinsre 150 Neomycin 100 Paromomycin 200	
Briggs-Leber-Bouillon (49)	Neopepton Difco	Glukose lösl. Stärke	Tomatensaft Tween 80		Leberextrakt Zystein-HCl
Modifikation (39)	Caseinpepton Fleischpepton	Glukose lösl. Stärke	Tomatensaft Tween 80	Sorbinsäure 400	
TPG-Medium	Phyton Tryptikase	Glukose	Hefeextrakt Magnesiumchlorid		Zystein

Zusätze in mg/l

Nährmedium	Grundstoffe	Kohlenhydrate	Wuchsstoffe	Hemmstoffe	Indikatoren und andere
Bifidobakterienmedium nach ATCC (58)	Casiton Pepton Trypton	Glukose	Hefeextrakt Tomatensaft		
PYST-Medium (35)	Pepton	Saccharose	Hefeextrakt Tween 80		
Medium für raue Oberflächen (65)	Trypton Tryptase	Glukose Laktose	Hefeextrakt Tomatensaft Tween 80		Leber
Medium nach Lauer/ Kandler (42)	Caseinpepton Fleischextrakt	Glukose	Hefeextrakt Tween 80		Na-askorbat Zystein-HCl
PYG-RF Medium (87)	Pepton	Glukose	Pansenflüssigkeit		Zysteinsulfid
Agar nach Hackenthal Bierkowski (58)	Pepton Pferdefleischinfus Blut	Glukose			Wasserblau

Zusätze in mg/l

Nährmedium	Grundstoffe	Kohlenhydrate	Wuchsstoffe	Hemmstoffe	Indikatoren und andere
Medium nach Mitsuka (50)	Neopepton	Glukose	Hefeextrakt Tomatensaft Magnesiumsulfat Mangansulfat		
TPY-Medium nach Scardovi (14)	Tryptikase Phyton	Glukose	Hefeextrakt Magnesiumchlorid Tween 80		Zystein-HCl

c) Differenzierungsnährböden für Bifidobakterien

Medium nach Haenel (58)	Caseinpepton Blut	verschiedene	Hefeextrakt Magnesiumsulfat Mangansulfat Tween 80	Na-azid 100	Bromkresolgrün Neutralrot
Medium nach Mitsuka (49)	Leberinfus Proteose Pepton Tryptikase	verschiedene	Hefeextrakt Tween 80		Bromkresol- purpur

Zusätze in mg/l

6.Material und Methoden

6.1. Versuchsplan

Folgende Fragen wurden im Rahmen der vorliegenden Studie einzeln untersucht:

- Vorversuche zur Überprüfung der Versuchsbedingungen
Aerotoleranz der Bifidobakterien im Versuch
Einfluß der Kohäsion der Bifidobakterien auf die Keimzählung
Bebrütungszeit
- Quantitative Untersuchung des Wachstums von Bifidobakterien
auf den Nährböden der Studie
- Quantitative Untersuchung der selektiven Eigenschaften
der Nährböden
- Qualitative Untersuchung der Eignung der Nährböden für
die Zählung von Bifidobakterien in Arzneimitteln oder Diäte-
tika und Lebensmitteln, in Speichel, Stuhl und Vaginalsekret

6.2. Nährböden und Stämme

6.2.1. Nährböden

Die folgenden im Handel erhältlichen Fertignährböden wurden verwendet:

Eugon-Agar (BBL)	Eugon
APT-Agar (Merck)	APT
Rogosa-Agar (Merck)	Rogosa
Sorbinsäure-Agar (Merck)	Sorbinsäure
Tomatensaft-Agar (Difco)	Tomatensaft
Milch-Agar (Oxoid)	Milch

Die folgenden Nährböden wurden nach den in der Literatur angegebenen Rezepten hergestellt:

Blut-Agar (Columbia Agar Base, Difco) mit 5% Schafblut	Blut
PYST-Medium nach Kotarski und Savage 5.4.2.1.	PYST
YN 6-Medium 5.4.2.2.	YN 6
Leber-Zystin-Milchzucker-Agar nach Blaurock 5.4.2.3	Blaurock
Tryptikase-Phyton-Glukose-Medium nach ATCC 5.4.2.4.	TPG
BI-Agar nach Ochi 5.4.2.5.	Ochi
Petuely-Medium modifiziert nach Tanaka und Mutai 5.4.2.6.	Petuely
VL-Agar nach Beerens 5.4.2.7	VL

Im Text werden häufig die hinter den vollen Bezeichnungen der Nährböden angegebenen Kurzformen verwendet.

6.2.2. Stämme

6.2.2.1. Bifidobakterien

a.	B. bifidum	DSM 20082
	B. dentium	DSM 20084
	B. adolescentis	DSM 20086
	B. infantis	DSM 20088
	B. breve	DSM 20091
	B. longum	DSM 20097
	B. animalis	DSM 20104
	B. infantis	DSM 20090
b.	B. angulatum	DSM 20098
	B. catenulatum	DSM 20103
	B. breve	DSM 20213
	B. magnum	DSM 20220

c.	<i>B. adolescentis</i>	DSM 20083
	<i>B. thermophilum</i>	DSM 20210
	<i>B. bifidum</i>	DSM 20456

Die unter b genannten Stämme konnten wegen sekundärer Verunreinigungen (20098) bzw. Absterben des Stammes (20103) nur in einem Teil der Versuche verwendet werden.

Die unter c genannten Stämme unterschieden sich in ihren biochemischen Eigenschaften so stark von den im Anaerobic Laboratory Manual (2) angegebenen Werten, daß ihre Identität nicht sicher nachzuweisen war. Diese Stämme wurden für die Hauptversuche nicht verwendet.

6.2.2.2. Bakterien anderer Gattungen

1. <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
2. <i>Micrococcus luteus</i>	DSM 348
3. <i>Streptococcus faecalis</i>	DSM 20060
4. <i>Streptococcus faecium</i>	DSM 20160
5. <i>Streptococcus faecium</i>	DSM 20382
6. <i>Streptococcus mitis</i>	ATCC 6249
7. <i>Streptococcus equinus</i>	DSM 20062
8. <i>Streptococcus sanguis</i>	DSM 20066
9. <i>Streptococcus bovis</i>	DSM 20063
10. <i>Streptococcus mutans</i>	DSM 20381
11. <i>Streptococcus milleri</i>	DSM 20061
12. <i>Staphylococcus aureus</i>	IS 1
13. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	IS 2
14. <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	IS 3
15. <i>Streptococcus faecalis</i>	IS 4
16. <i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
17. <i>Bacillus sphaericus</i>	ATCC 121123
18. <i>Bacillus firmus</i>	DSM 359
19. <i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
20. <i>Escherichia coli</i>	IS 5

21. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	IS 6
22. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	IS 7
23. <i>Enterobacter cloacae</i>	IS 8
24. <i>Serratia marcescens</i>	IS 9
25. <i>Proteus vulgaris</i>	IS 10
26. <i>Proteus vulgaris</i>	IS 11
27. <i>Proteus mirabilis</i>	IS 12
28. <i>Proteus mirabilis</i>	IS 13
29. <i>Proteus morgani</i>	IS 14
30. <i>Citrobacter</i> sp.	IS 15
31. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 72853
32. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	IS 16
33. <i>Branhamella catarrhalis</i>	IS 17
34. <i>Neisseria flava</i>	IS 18
35. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IS 19
36. <i>Lactobacillus casei</i>	DSM 20011
37. <i>Lactobacillus fermentum</i>	DSM 20092
38. <i>Lactobacillus buchneri</i>	IS 20
39. <i>Veillonella</i> sp.	IS 21
40. <i>Fusobacterium nucleatum</i>	IS 22
41. <i>Clostridium difficile</i>	IS 23
42. <i>Clostridium bifermentum</i>	IS 24
43. <i>Clostridium bifermentum</i>	ATCC 1172
44. <i>Clostridium perfringens</i>	IS 25
45. <i>Clostridium perfringens</i>	IS 26
46. <i>Bacteroides vulgatus</i>	IS 27
47. <i>Bacteroides fragilis</i>	IS 28
48. <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	IS 29
49. <i>Peptococcus prevotii</i>	IS 30
50. <i>Bacteroides ovatus</i>	IS 31
51. <i>Bacteroides vulgatus</i>	IS 32
52. <i>Clostridium difficile</i>	IS 33
53. <i>Eubacterium moniforme</i>	IS 34
54. <i>Bacteroides distasonis</i>	IS 35
55. <i>Bacteroides distasonis</i>	IS 36
56. <i>Bacteroides bivius</i>	IS 37

57. <i>Bacteroides bivius</i>	IS 38
58. <i>Eubacterium limosum</i>	DSM 20517
59. <i>Eubacterium lentum</i>	IS 39
60. <i>Eubacterium aerofaciens</i>	IS 40
61. <i>Bacteroides vulgatus</i>	IS 41
62. <i>Bacteroides ovatus</i>	IS 42
63. <i>Peptococcus prevotii</i>	IS 43
64. <i>Peptococcus asaccharolyticus</i>	IS 44
65. <i>Peptococcus asaccharolyticus</i>	IS 45
66. <i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	IS 46

DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen
ATCC	American Type Culture Collection
IS	Institutssammlung

6.3. Methoden

6.3.1. Vorversuche zur Überprüfung der Versuchsbedingungen

6.3.1.1. Prüfung der Aerotoleranz

In diesem Vorversuch wurde geprüft, inwieweit die Sauerstoffexposition während der Vorbereitungsarbeiten (Überimpfen, Homogenisieren, Aussspateln) das Wachstum der Bifidobakterien beeinflusst. Hierzu wurde der Stamm *Bifidobacterium breve* DSM 20213 in Schaedler-Bouillon angezüchtet und auf Eugon gehalten. In phosphatgepufferter Kochsalzlösung mit pH 7,2-7,4 (PBS) wurde eine Suspension hergestellt und am Eppendorf Digitalphotometer 6114 S (Filter 546 nm, Schichtdicke 1 cm) gegen PBS auf eine Extinktion von 0,7 eingestellt. Von dieser Suspension wurde 0,5 ml in 4,5 ml PBS pipettiert und 1 Minute lang geschüttelt und in gleicher Weise bis zur Endstufe $1 : 10^4$ verdünnt. Je 92 µl der letzten Verdünnungsstufe wurden auf präreduziertem Rogosa-Agar ausgeimpft (Spiralsystem, Gerät TM, Modell CU).

Die restliche Suspension wurde geteilt, ein Teil unter strömendem CO_2 , der andere an der Luft stengelassen; beide wurden wie oben beschrieben nach 10, 20, 30, 60 und 120 Minuten ausgeimpft und die Platten sofort unter anaeroben Bedingungen (GASPAK System) bebrütet. Die Ablesung erfolgte nach zwei Tagen.

6.3.1.2. Ermittlung der optimalen Schüttelzeit

In diesem Vorversuch sollte geprüft werden, ob und in welchem Maße die Dauer des Schüttelns durch die Desaggregation von Wuchsverbänden die Zahl der Bifidobakterien beeinflusst. Die Suspension wurde hergestellt und verdünnt wie unter 6.3.1.1. beschrieben. Die Suspension $1 : 10^4$ wurde in fünf Portionen geteilt. Diese wurden 30, 60, 90, 120, 150 und 180 Sekunden unter strömendem CO_2 geschüttelt und wie oben auf Rogosa ausgeimpft. Nach dem Ausimpfen wurden die Platten wie unter 6.3.1.1. beschrieben bebrütet. Die Ablesung erfolgte nach fünf Tagen.

6.3.1.3. Ermittlung der Bebrütungsdauer und Prüfung verschiedener anaerober Kulturverfahren

Dazu wurden mehrere Versuche durchgeführt.

Versuch 1:

Der Stamm *Bifidobacterium breve* DSM 20231 wurde suspendiert und verdünnt, wie bereits beschrieben, jeweils eine Minute geschüttelt und mit CO_2 begast. 100 μl dieser Suspension wurden auf Eugon ausgespatelt und im GASPAK Verfahren inkubiert. Die Ablesung erfolgte nach zwei Tagen.

Versuch 2:

Der Stamm *Bifidobacterium dentium* DSM 20084 wurde auf die

gleiche Weise suspendiert, verdünnt und auf Eugon ausgespatelt. Die Verdünnung wurde jedoch unter anaeroben Bedingungen (Anaerobic System Forma Scientific, Model 1024) vorgenommen. Die Platten wurden in luftdichten Metallgefäßen (Whitley) bebrütet, die 15 Minuten lang mit einem Gasgemisch (N_2 85%, H_2 10%, CO_2 5%) geflutet worden waren. Die Bebrütungsdauer betrug sechs Tage.

Versuch 3:

Suspensionen verschiedener Bifidobakterienstämme wurden wie im Versuch 2 unter anaeroben Bedingungen hergestellt, verdünnt und ausgespatelt. Die anaerobe Atmosphäre für die Inkubation wurde bei der einen Hälfte der Platten wie im Versuch 2, bei der anderen Hälfte durch die Anwendung von Anaerocult Merck hergestellt. Die Bebrütungsdauer betrug jeweils vier Tage.

6.3.2. Vergleichende quantitative Prüfung des Wachstums der Bifidobakterien auf den Nährböden

Aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche wurden für diese Untersuchung folgende Bedingungen gewählt:

- Einstellung der Stammsuspension in PBS auf eine Extinktion von 0,7 bzw. 0,2
- Verdünnung der Suspension von $1 : 10^1$ bis $1 : 10^4$
- Ausspateln von 100 μ l der Verdünnungen $1 : 10^2$, $1 : 10^3$ und $1 : 10^4$ auf die verschiedenen Nährböden
- Viertägige Bebrütung in begasten Töpfen oder mit Anaerocult

Die Herstellung der Stammsuspensionen erfolgte wie unter 6.3.1.1. beschrieben; sämtliche Arbeiten wurden im Anaerobenschrank ausgeführt. Da das Ausimpfen mit dem Spiralsystem

unter anaeroben Bedingungen nicht möglich ist, wurde die Bakteriensuspension ausgespatelt.

Die bei diesem Versuch verwendeten Stämme wurden in Schaedler-Bouillon angezüchtet, auf Blut und Eugon überimpft und im Anaerobenschrank aufbewahrt.

Versuchsablauf

Es mußten drei Versuchsreihen durchgeführt werden, da die auftretenden Probleme erst in der dritten Versuchsanordnung zufriedenstellend ausgeräumt werden konnten.

Versuch 1:

Es wurden 11 Stämme von Bifidobakterien und ein Stamm Eubacterium auf folgenden Nährböden untersucht:

Blaurock	TPG
Ochi	YN 6
PYST	Rogosa
Eugon	Petuely
VL	APT
Sorbinsäure	Milch
Tomatensaft	Blut

Der Versuch wurde wie oben beschrieben durchgeführt, wobei die Bakteriensuspension auf Extinktion 0,7 eingestellt war und durch Gasbeflutung eine anaerobe Atmosphäre hergestellt wurde.

Versuch 2:

Aufgrund des langsamen Wachstums einiger Stämme erwies sich die Einstellung der Suspension auf Extinktion 0,7 teilweise als schwierig. Auch bei einer Einstellung auf Extinktion 0,2 war eine gute Ablesbarkeit gewährleistet; und so wurden die Ver-

suchsbedingungen gegenüber 6.3.2.1. modifiziert, indem die Extinktion auf 0,2 eingestellt wurde.

In dieser Versuchsreihe wurde die Zahl der Nährböden auf neun beschränkt, da sich gezeigt hatte, daß optimales Wachstum von Bifidobakterien auch auf einfachen Fertignährböden erzielt werden kann. Damit erübrigen sich aufwendige Herstellungsvorgänge für die nicht im Handel erhältlichen Medien.

Folgende Nährböden wurden verwendet:

Blut	Milch
Tomaten	APT
Eugon	YN 6
Petuely	Sorbinsäure
Rogosa	

Bei einigen der verwendeten Stämme wurden veränderte biochemische Eigenschaften beobachtet, so daß die Untersuchung nur teilweise ausgewertet werden konnte.

Versuch 3:

Mit frischen Bifidobakterienstämmen, deren Identität gewährleistet war, wurde eine weitere Versuchsreihe unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die Suspension wurde photometrisch auf Extinktion 0,2 eingestellt; die Herstellung der anaeroben Atmosphäre erfolgte mit Anaerocult. Der Versuch wurde insgesamt 10 x wiederholt, um dadurch reproduzierbare, statistisch auswertbare Ergebnisse zu erhalten.

6.3.3. Vergleichende quantitative Prüfung der selektiven Eigenschaften der Nährböden mit Bakterienarten anderer Gattungen als Bifidobacterium

Die Teststämmen wurden suspendiert, verdünnt und ausgespatelt wie unter 6.3.2. (Versuch 2) beschrieben.

Es wurden zwei Versuche durchgeführt.

Versuch 1:

Ein erster orientierender Versuch wurde mit 13 Nährböden und acht Stämmen aerober und anaerober Bakterien durchgeführt. Folgende Bakterienstämme wurden untersucht:

Peptococcus
Escherichia coli
Clostridium
Pseudomonas aeruginosa
Staphylococcus aureus
Eubacterium
Streptococcus

Die Inkubation erfolgte über zwei Tage nach Gasbeflutung, da kein direkter Vergleich zum Wachstum der Bifidobakterien-Teststämme gezogen werden sollte.

Versuch 2:

In diesem Hauptversuch wurden 66 Stämme aerober und anaerober Bakterien (vgl. 6.2.2.2.) untersucht. Dieser Versuch wurde mit neun Nährböden (vgl. 6.2.2, Versuch 2) durchgeführt; die Bebrütung erfolgte vier Tage lang mit Anaerocult. Auf diese Weise konnte ein besserer Vergleich mit den Wachstumsraten der ebenfalls vier Tage bebrüteten Bifidobakterien-Teststämme vorgenommen werden. Die Platten ließen sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen auch nach vier Tagen problemlos ablesen.

6.3.4. Untersuchungen von Arzneispezialitäten und Joghurtzubereitungen

Auf neun Nährböden (6.2.2, Versuch 2) wurden Zubereitungen untersucht, in denen Bifidobakterien und Laktobazillen ent-

halten sind. Alle Arbeitsschritte wurden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt, die Ablesung erfolgte nach viertägiger Bebrütung mit Anaerocult.

Aus der jeweiligen Ausgangssuspension wurden Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-8} hergestellt und die Verdünnungen 10^{-2} bis 10^{-6} je zweimal ausgespatelt.

Folgende Präparate wurden untersucht:

Ribolac (Zyma)

Darreichungsform:	Pulver
Deklarierte Zusammensetzung:	1×10^8 Lactobacillus acidophilus / g
Ausgangssuspension:	1 g in 10 ml PBS

Omniflora (Med Fabrik)

Darreichungsform:	Kapseln
Deklarierte Zusammensetzung:	Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus bifidus, Escherichia coli, 75 mg Lyophilisat / Kapsel
Ausgangssuspension:	3 Kapseln in 2,25 ml PBS

Döderlein Med (Med Fabrik)

Darreichungsform:	Vaginalkapseln
Deklarierte Zusammensetzung:	10^9 - 10^{10} Lactobacillus acidophilus / 200 mg
Ausgangssuspension:	2 Kapseln in 4 ml PBS

DE Medinova (Fink GmbH)

Darreichungsform:	Vaginaltabletten
-------------------	------------------

Deklarierte Zusammensetzung: $10^7 - 7 \times 10^8$ Lactobacillus
acidophilus / 50 mg
Ausgangssuspension: 1 Tablette / ml, sonst nicht
löslich

Eugalan Töpfer forte Pulver (Töpfer)

Darreichungsform: Pulver
Deklarierte Zusammensetzung: 10^5 Bifidobakterien / g
Ausgangssuspension: 1 g / 10 ml

Joghurts

Biodyn Trinkjoghurt (Molkerei Scheitz, 8138 Andechs)

Deklarierte Zusammensetzung: Lactobacillus acidophilus,
Bifidobacterium bifidum, BioGARDE^R
L(+)-Milchsäure, 3,7% Fett
Ausgangssuspension: 500 mg / 5 ml

Bifighurt (Nestlé GmbH München, Chambourcy)

Ausgangssuspension: 500 mg / 5 ml

BA aktiv (Versuchspräparat der Südmilch AG, Stuttgart)

Ausgangssuspension: 500 mg / 5 ml

**6.3.5. Untersuchung zur Tauglichkeit der Nährböden für den
quantitativen Nachweis von Bifidobakterien aus dem
Speichel**

Von zehn gesunden Personen verschiedenen Geschlechts und
Lebensalters wurde mit einer Pasteurpipette Speichel ent-
nommen. Die Probenentnahme erfolgte nüchtern; die Probanden
nahmen zur Versuchszeit keine Medikamente.

Der Speichel wurde mit PBS von 10^{-1} bis 10^{-6} verdünnt. Die Untersuchung erfolgte auf den neun unter 6.2.2. angegebenen Nährböden, wobei die unter 6.3.4. angegebenen Versuchsbedingungen eingehalten wurden.

6.3.6. Untersuchung zur Tauglichkeit der Nährböden für den quantitativen Nachweis von Bifidobakterien aus dem Stuhl

Frische Stuhlproben (ca. 5-20 g) von elf gesunden Versuchspersonen (Frauen und Männer verschiedener Altersgruppen) wurden untersucht.

1 g Stuhl wurde in 9 ml PBS suspendiert. Diese Suspension wurde von 10^{-1} bis 10^{-11} mit PBS verdünnt. Wieder fanden neun Nährböden (6.2.2.) Verwendung; die Versuchsbedingungen wurden wie unter 6.3.4. eingehalten.

Die Identifizierung der Bifidobakterien erfolgte bei den Proben 1 - 9 lediglich aufgrund mikroskopischer Merkmale; bei den Proben 9 - 11 wurden zusätzlich biochemische Untersuchungen zur Identifizierung der grampositiven Stäbchen durchgeführt.

6.3.7. Untersuchung zur Tauglichkeit der Nährböden für den quantitativen Nachweis von Bifidobakterien aus dem Vaginalsekret

Von elf gesunden Versuchspersonen, darunter zwei Schwangeren, wurde Vaginalsekret entnommen und sofort unter anaeroben Bedingungen verarbeitet.

Aus dem Untersuchungsmaterial wurde mit PBS eine Suspension im Verhältnis 1 : 10^3 hergestellt.

Eine zweite Suspension wurde mit PBS im Verhältnis 1 : 10^2 hergestellt und bis 1 : 10^5 weiterverdünnt.

Von den Suspensionen der Verdünnungsstufen $1 : 10^1$ bis $1 : 10^5$ wurden jeweils 100 μ l auf die Nährböden ausgespatelt.

Auf Blut und Rogosa wurden jeweils 100 μ l Sekret unverdünnt ausgespatelt, um auch niedrige Keimzahlen zu erfassen.

6.4. Statistische Auswertung

Die Zahl der Koloniebildner in der Ausgangssuspension wurde gemäß Cavalli-Sforza (19) nach folgender Formel errechnet:

$$x = \frac{\sum S c_i}{\sum S n_i \times z_i}$$

$\sum S c_i$	Summe aller gezählten Kolonien auf den Platten aller zählbaren Verdünnungen
n	Zahl der zählbaren Platten
z	zählbare Verdünnungen

Die Keimzahlen werden als dekadische Logarithmen angegeben, die Versuchsergebnisse werden in Tabellen oder graphisch dargestellt.

Die Versuche mit Bifidobakterien wurden 10 x hintereinander durchgeführt; teilweise starben jedoch die Stämme ab oder zeigten veränderte Eigenschaften. Derartige Versuche wurden von der statistischen Berechnung ausgeschlossen. Die in den nachfolgenden Tabellen angegebenen Zahlen sind die Mittelwerte aller simultan durchgeführten Untersuchungen.

7. Ergebnisse

7.1. Vorversuche zur Prüfung der Versuchsbedingungen

7.1.1. Aerotoleranz

Bereits nach 20 minütigem Einwirken von Luftsauerstoff auf die Bakteriensuspension ließ sich bei dem getesteten Stamm von *Bifidobacterium breve* DSM 20213 ein signifikanter Unterschied gegenüber der unter CO₂ Begasung verwahrten Suspension feststellen (4 gegenüber 300 Kolonien). Nach 30 minütiger aerober Aufbewahrung wuchsen die Bakterien nicht mehr.

7.1.2. Desintegration von Zellverbänden

Die Verlängerung der Schüttelzeit hatte keinen Einfluß auf die Koloniezahl. Der Stamm *B. bifidum* DSM 20082 weist eine besonders starke Kohäsion der Zellverbände auf. Eine homogene Suspension läßt sich bei diesem Stamm nur herstellen, wenn die Bakterienmasse vor Herstellung der Suspension mit wenig PBS angerieben wird. Auch bei diesem Stamm hatte jedoch das Schütteln keinen weiteren Einfluß auf die Verteilung der Zellen.

7.1.3. Bebrütungsdauer, Herstellung anaerober Verhältnisse

Drei verschiedene anaerobe Arbeitstechniken wurden miteinander verglichen:

- CO₂ Beflutung in Kombination mit dem GASPAC System
- Gasbeflutung im Anaerobenschrank in Kombination mit Bebrütung in luftdichten, gasgefluteten Metallgefäßen (Whitley)
- Gasbeflutung im Anaerobenschrank in Kombination mit Anaerocult.

Beim ersten Verfahren ergaben sich innerhalb der Versuchsreihe uneinheitliche Werte, während die beiden anderen Verfah-

ren stets zu gutem Wachstum der Bifidobakterien führten. Die quantitativen Ergebnisse beider Verfahren sind unter Berücksichtigung der statistischen Abweichung gleich.

Als geeignete Inkubationszeit wurden vier Tage ermittelt, da die Kolonien nach dieser Zeit ausreichend groß für die Zählung und die Beurteilung sind.

7.2. Ergebnisse der vergleichenden Prüfung des Wachstums der Bifidobakterien auf den verwendeten Nährböden

7.2.1. Quantitative Ergebnisse

Die Untersuchung auf 13 Nährböden mit Bakteriensuspensionen der Extinktion 0,7 (Versuch 1) und der erste Durchgang mit neun Nährböden (Versuch 2) wurden lediglich qualitativ ausgewertet. Eine quantitative Aussage erscheint hier aufgrund der schwankenden Wachstumseigenschaften der Stämme als wenig sinnvoll. Als besonders schwankend in Bezug auf ihre Wachstumsrate erwiesen sich die Stämme *B. dentium* DSM 20084, *B. catenulatum* DSM 20103, *B. angulatum* DSM 20098 und *B. longum* DSM 20097.

Die gleichen Beobachtungen hinsichtlich der oben genannten Stämme wurden im Versuch 3 gemacht, die Standardabweichungen lagen höher als bei den übrigen untersuchten Stämmen. Die quantitativen Ergebnisse des Versuch 3 sind in Abb. 2 graphisch dargestellt; die der Darstellung zugrundeliegenden Werte sind in Tab. 10 enthalten.

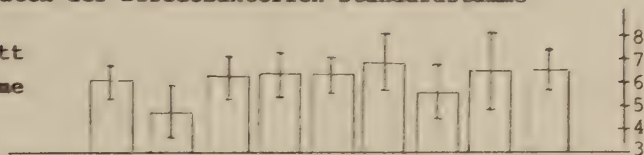
7.2.2. Qualitative Ergebnisse

Die untersuchten Nährböden sind nicht in dem Maße selektiv, wie es zu Beginn der Studie erwartet worden war. Aus diesem Grund kommt der Differenzierung anhand der Kolonieformen große Bedeutung zu. Die Kolonieformen der Teststämmen sind in Tab. 11 beschrieben.

Abb.2

Wachstumsraten der Bifidobakterien-Standardstämme

Durchschnitt
aller Stämme



B. infantis
DSM 20088



B. breve
DSM 20091



B. angulatum
DSM 20098



B. magnum
DSM 20220



B. longum
DSM 20097



Blut
Milch
Tomaten
APT
Eugon
YN 6
Petuely
Sorbinsäure
Rogosa

Fortsetzung Abb.2

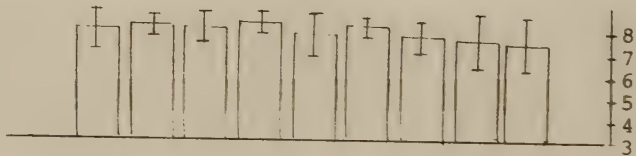
B. animalis
DSM 20104



B. catenulatum
DSM 20103



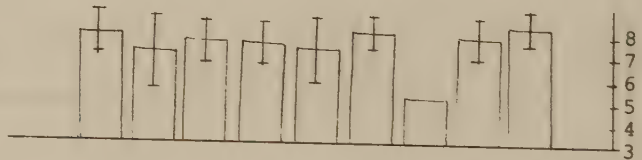
B. infantis
DSM 20090



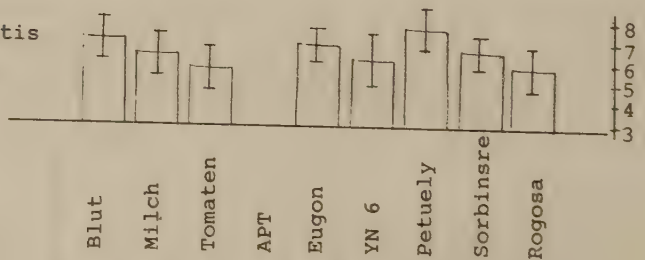
B. bifidum
DSM 20082



B. dentium
DSM 20084



B. adolescentis
DSM 20086



	B. animalis DSM 20104	B. catenulatus DSM 20103	B. infantis DSM 20090	B. bifidum DSM 20082	B. dentium DSM 20084	B. adolescentis DSM 20086	B. infantis DSM 20088	B. breve DSM 20091	B. angulatus DSM 20098	B. magnum DSM 20220	B. longum DSM 20097	Durchschnitt aller Stämme
Blut	6,34	5,99	7,22	5,39	6,81	5,87	6,52	5,08	5,31	6,57	5,83	6,08
Milch	5,90	3,94	7,36	5,28	6,22	5,49	4,25	6,60	5,48	5,91	6,28	5,70
Tomaten	5,54	5,28	7,14	5,26	6,63	4,80	5,32	6,33	5,68	6,11	6,65	5,89
APT	5,54	5,01	7,50	5,23	6,81	-	6,10	6,70	4,55	5,70	5,64	5,88
Eugon	6,13	5,85	7,40	5,55	6,46	5,70	6,56	6,66	5,64	7,00	6,02	6,27
YN 6	6,17	5,50	7,20	4,94	7,00	4,94	5,18	6,56	5,41	6,33	5,92	5,92
Petuely	6,16	5,54	7,04	5,02	4,55	5,52	6,39	4,67	4,66	4,95	4,36	5,35
Sorbinsäure	4,93	5,61	6,79	5,40	6,82	5,55	6,19	6,80	5,62	5,40	5,98	5,92
Rogosa	5,13	6,15	6,28	5,41	6,99	5,13	6,15	6,49	5,50	6,31	5,93	5,95

Tab. 11

Koloniemorphologie der Standardstämme

	B. bifidum DSM 20082	B. dentium DSM 20084	B. adolescentis DSM 20086	B. infantis DSM 20088
Blaurock-Agar	Ø 0,5 mm flach durchscheinend	Ø 0,5-1 mm flach durchscheinend	Ø 0,5-1 mm flach durchscheinend	Ø 0,5-1 mm punktförmig blau
TPG-Medium	Ø 0,5-2 mm flach, glänzend weiß	Ø 0,5-1 mm punktförmig	Ø 0,5 mm punktförmig weiß	Ø 2-3 mm gewölbt gelblich
Medium nach Ochi	Ø 0,5-5 mm ineinanderhängend gefranter Rand	Ø 0,5-1 mm gewölbt, glänzend rosa Schimmer	Ø 1-2 mm glänzend, farbl. Rand weißes Zentrum	Ø 0,5-3 mm glänzend weiß
YN 6-Medium	Ø 0,5 mm flach, tropfenförmig dunkelblau	Ø 2 mm gewölbt, glänzend hellblau	Ø 0,5-1 mm leicht gewölbt hellblau	Ø 0,5 mm punktförmig hellblau
PYST	Ø 0,5-1 mm flach weiß	Ø 0,5-1 mm punktförmig weiß	Ø 0,5-1 mm glänzend weiß	Ø 0,5-1 mm durchscheinend weiß
Medium nach Petuely	Ø 0,5 mm flach, punktförmig durchscheinend	Ø 0,5-1 mm leicht gewölbt durchscheinend	Ø 0,5-3 mm ineinanderhängend durchscheinend	Ø 0,5 mm schleimig, ineinander- hängend, durchscheinend
VL-Medium	Ø 3-5 mm flach, ineinander- hängend, weiß	Ø 0,5 mm punktförmig, glänzend, weiß	Ø 1-2 mm punktförmig, glänzend, weiß	Ø 0,5 mm glänzend gelblich
Rogosa-Agar	Ø 0,5-4 mm flach ineinanderhängend	Ø 0,5-1 mm punktförmig, gewölbt, glänzend	Ø 0,5-1 mm durchscheinend gelblich	Ø 1 mm glänzend, flach Rand aufgeheilt

Fortsetzung Tab.11

Blut-Agar	Ø 0,5-2 mm Hämolyse, flach Rand aufgehell	Ø 0,5-1 mm Hämolyse, glänzend weiß	Ø 0,5-1 mm Hämolyse, gewölbt weiß	Ø 0,5-1 mm Hämolyse, glänzend weiß
Eugon-Agar	Ø 0,5-3 mm flach, matt weiß	Ø 0,5-1 mm punktförmig weiß	Ø 0,5 mm punktförmig weiß	Ø 1-2 mm glänzend weiß
APT-Agar	Ø 0,5-3 mm flach innen weiß, außen rosa	Ø 1-2 mm gewölbt, weiß Rand aufgehell	Ø 2-3 mm flach, schleimig glänzend	Ø 0,5-1 mm glänzend rosa
Sorbinsäure-Agar	Ø 0,5-1 mm flach, rosa Mitte dunkler	Ø 0,5-1 mm glänzend rötlich	Ø 1 mm gewölbt, glänzend weiß	Ø 0,5 mm gewölbt rosa
Milch-Agar	Ø 0,5-2 mm flach, glasartig glänzend, weiß	Ø 0,5-1 mm punktförmig durchscheinend	Ø 0,3-0,5 mm punktförmig weiß	
Tomatensaft-Agar	Ø 0,5-2 mm flach, ineinander- hängend, färriger Rd.	Ø 0,5-1 mm tautropfenartig glänzend, rosa	Ø 0,5-1 mm tautropfenartig rosa	Ø 0,5-1 mm tautropfenartig rosa

	B. infantis DSM 20090	B. breve DSM 20091	B. longum DSM 20097	B. animalis DSM 20104
Blaurock-Agar	Ø 0,5 mm glänzend weiß	Ø 3-4 mm flach, gezackter Rd. weiß	Ø 0,3-0,5 mm gewölbt, glänzend glatter Rand	Ø 0,5-3 mm flach, gelappter Rand weiß, Mitte aufgeheilt
TPG-Medium	Ø 1-3 mm glänzend, gewölbt Rand gelappt	Ø 5-6 mm flach, glänzend weiß	Ø 3-5 mm flach, glänzend gelblich	Ø 1-2 mm flach weiß
Medium nach Ochi	Ø 0,5-1 mm glänzend gewölbt	Ø 0,5 mm gewölbt weiß bis rosa	Ø 2-3 mm schleimig, gewölbt gelblich	Ø 1-3 mm glänzend, leicht gewölbt weiß mit rötl. Rand
YN 6-Medium	Ø 0,5 mm leicht gewölbt grau	Ø 1 mm punktförmig hellblau	Ø 0,5-1 mm flach, matt hellblau	Ø 0,5 mm punktförmig weiß, Mitte aufgeheilt
PYST	Ø 1-2 mm glänzend, gewölbt rötlich	Ø 0,5-1 mm punktförmig durscheinend	Ø 0,2-3 mm gewölbt, glänzend weißlich, Mitte dunkler	Ø 1-2 mm flach durscheinend
Medium nach Petuely		Ø 0,2-0,5 mm punktförmig weißlich	Ø 0,5 mm tropfenartig durscheinend	Ø 1-2 mm flach, glänzend gelappter Rand
VL-Medium	Ø 0,5-2 mm schleimig, gewölbt weiß	Ø 0,2-0,5 mm gewölbt weiß	Ø 0,5-3 mm gewölbt, glänzend weiß	Ø 0,5-2 mm gewölbt, glänzend weiß
Rogosa-Agar	Ø 0,5 mm glänzend gewölbt	Ø 0,5 mm schleimig ineinanderhängend	Ø 0,5-5 mm schleimig gewölbt	Ø 1-3 mm gewölbt, glänzend glatter Rand

Blut-Agar	Ø 0,5 mm Hämolyse, glänzend grau-blau	Ø 2 mm flach, schleimig Mitte aufgehell	Ø 2-3 mm flach grau	Ø 0,2-2 mm tropfenartig durchscheinend
Eugon-Agar	Ø 0,5-1 mm glänzend weiß	Ø 1 mm flach, glänzend weiß	Ø 0,5-1 mm tropfenartig, glänzend durchscheinend	Ø 2-3 mm glänzend weiß
APT-Agar	Ø 0,5-2 mm gewölbt, schleimig rosa	Ø 0,5 mm glänzend rötlich	Ø 0,5-1 mm gewölbt rosa	Ø 0,5-2 mm schleimig, glänzend durchscheinend bis weiß
Sorbinsäure-Agar	Ø 0,5 mm gewölbt, glänzend weiß bis leicht rosa	Ø 1-2 mm gewölbt, schleimig glänzend	Ø 5 mm gewölbt, schleimig rosa	Ø 2 mm schleimig flach, rötlich
Milch-Agar	Ø 0,3-0,5 mm punktförmig weiß	Ø 0,5-2 mm flach bis leicht gewölbt weiß	Ø 0,2-0,3 mm schleierartig weiß	Ø 1-2 mm flach weiß
Tomatensaft-Agar	Ø 0,5 mm flach rötlich	Ø 1 mm flach, glänzend rosa		Ø 1-2 mm flach rötlicher Rand

7.3. Ergebnisse der vergleichenden quantitativen Prüfung der selektiven Eigenschaften der Nährböden mit Bakterien anderer Gattungen als *Bifidobacterium* sp.

7.3.1. Quantitative Ergebnisse

Die selektive Wirkung in dieser Versuchsreihe ergab sich aus den anaeroben Bedingungen einerseits und aus den enthaltenen Selektivstoffen andererseits. Ein Teil der untersuchten Stämme wie *Pseudomonas aeruginosa*, Mikrokokken und Bazillen wuchs unter den gegebenen anaeroben Bedingungen gar nicht.

Enterobacteriaceae wurden auf den Medien Eugon, YN 6, Petuely, Sorbinsäure und Rogosa größtenteils gehemmt. Milch unterdrückte einen Teil der *Bacillus*-Stämme. Auf Milch und Tomaten wurden Eubakterien und Peptokokken teilweise unterdrückt.

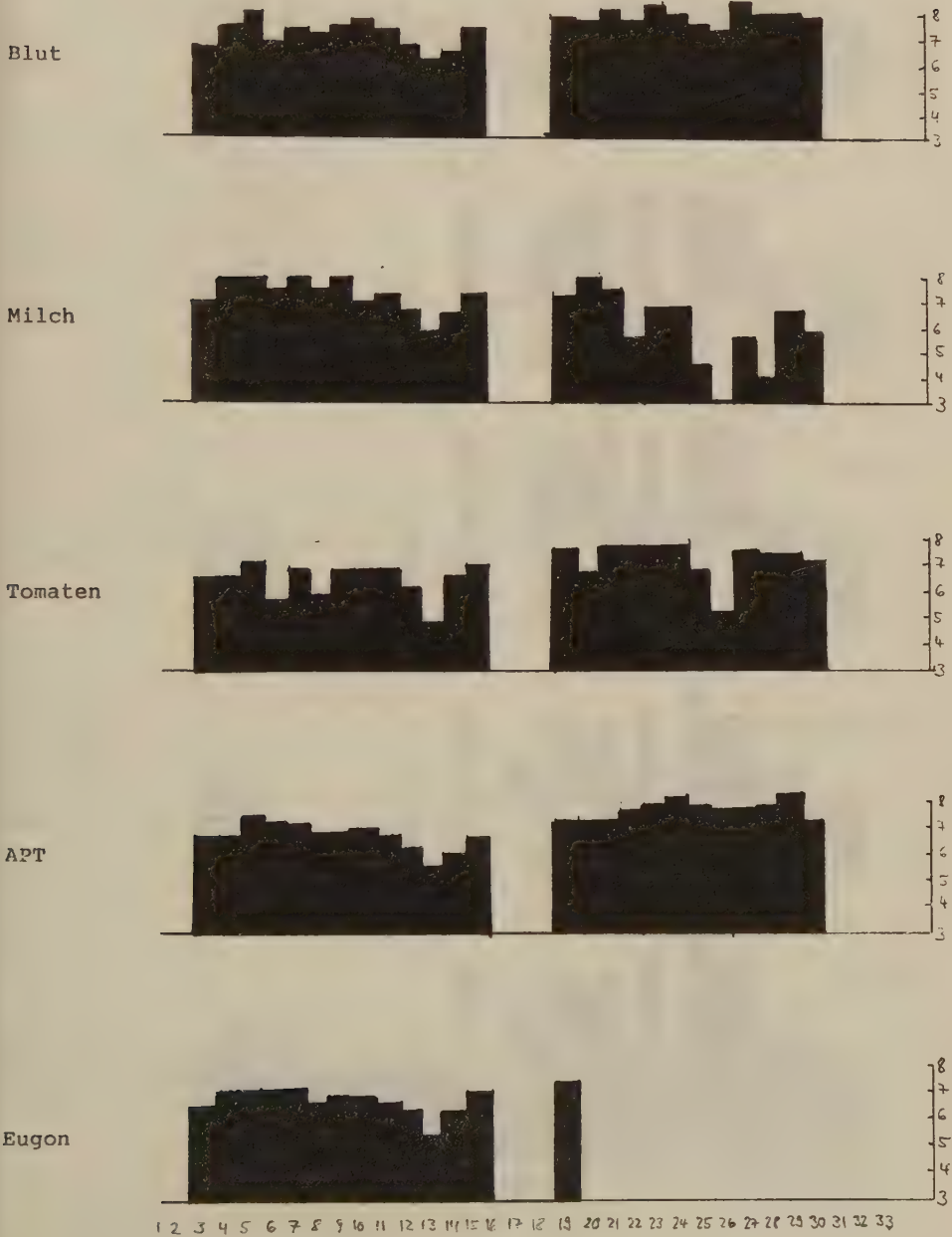
Die besten selektiven Eigenschaften zeigte Petuely, gefolgt von Sorbinsäure und Rogosa. Streptokokken und Laktobazillen wurden praktisch nur von Petuely weitgehend unterdrückt. Auf Petuely wuchsen lediglich einige Streptokokken-, Bacteroides- und *Bacillus*arten.

Auf YN 6 zeigten die Stämme ein sehr ungleichmäßiges Verhalten; Clostridien und Streptokokken wurden zufriedenstellend gehemmt. Sorbinsäure und Rogosa hemmten Bacteroidesarten (*B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*), die auf Petuely und YN 6 wuchsen. Laktobazillen, Clostridien, Peptokokken und Streptokokken wurden auf Sorbinsäure und Rogosa nicht unterdrückt. Auf APT wurden nur sehr wenige Arten wie *Fusobacterium nucleatum* am Wachstum gehindert.

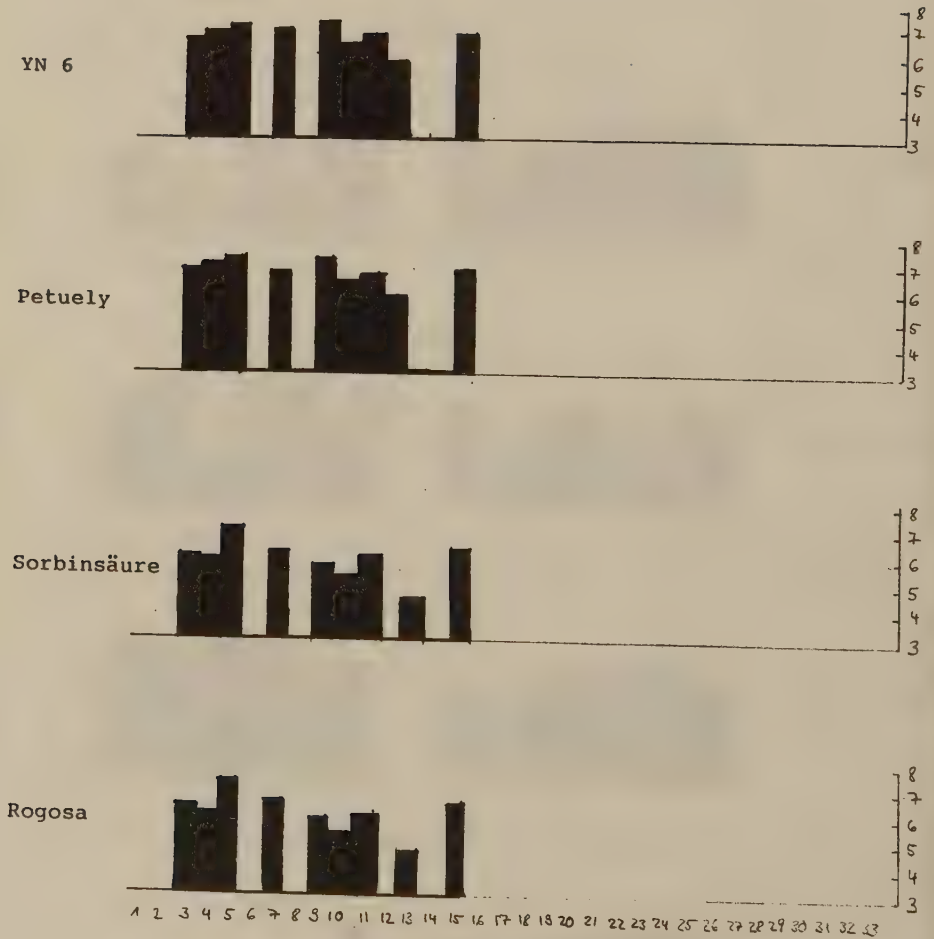
Die Versuchsergebnisse sind in Abb. 3 dargestellt.

Abb.3

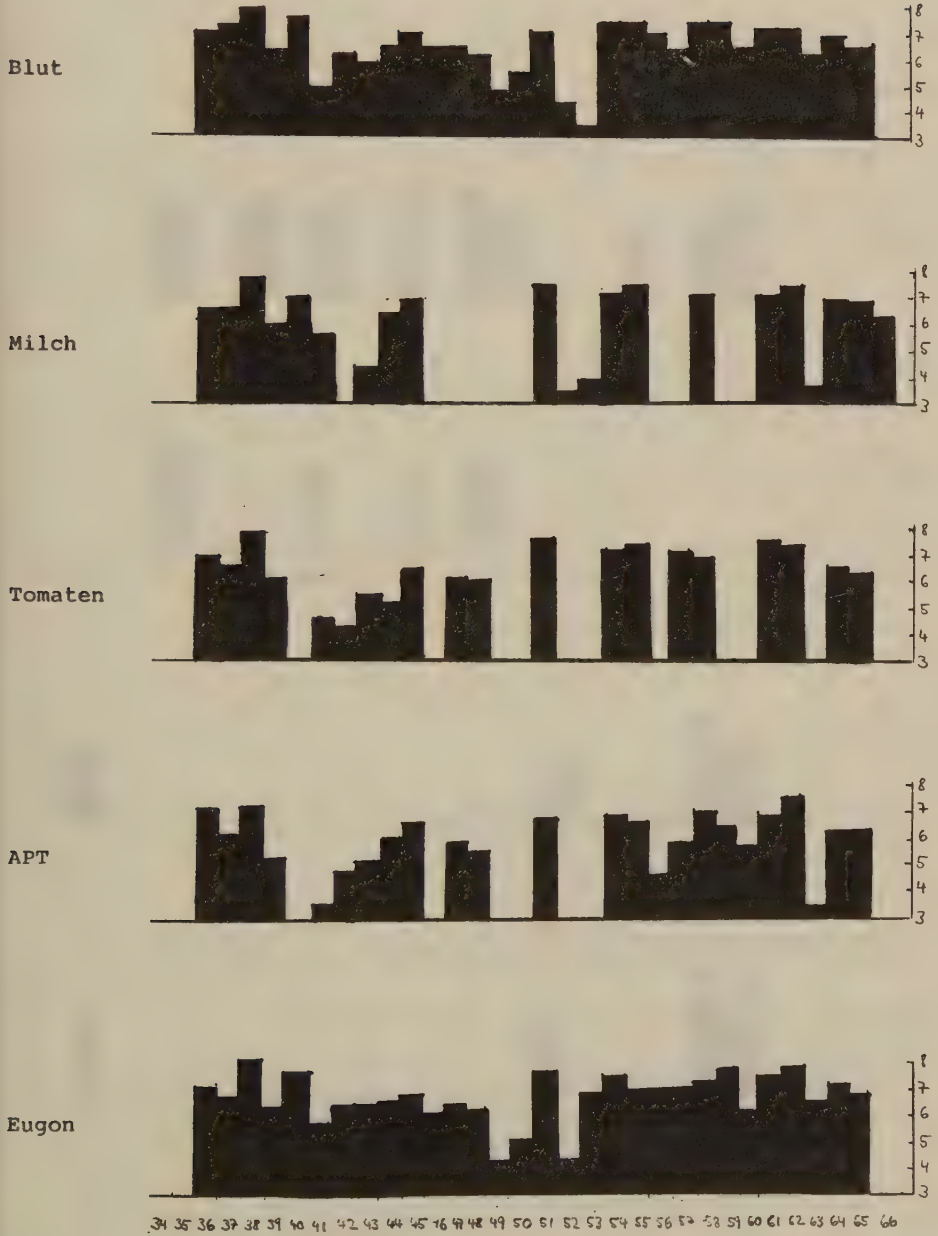
Wachstumsrate ($\log_{10}$) verschiedener Spezies (Bezifferung nach 6.2.2.2.)



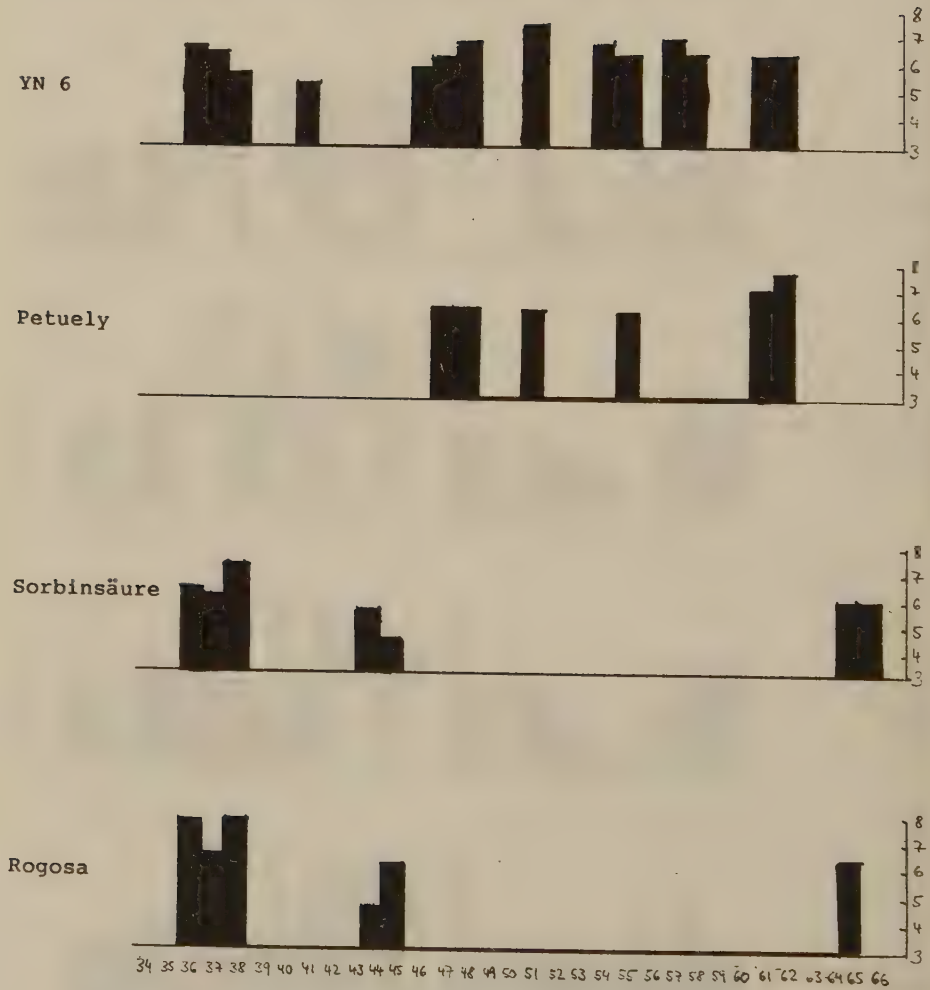
Fortsetzung Abb.3



Fortsetzung Abb.3



Fortsetzung Abb.3



	Lactobacillus bulgaricus DSM 20080	Lactobacillus casei	Lactobacillus buchneri
Blut-Agar	Ø 0,5-2 mm flach grau	Ø 0,5 mm glänzend, gewölbt weißlich	Ø 0,5 mm punktförmig weißlich
Milch-Agar	Ø 0,5-2 mm glänzend durchscheinend	Ø 2-3 mm Mitte gewölbt, Rand flach	Ø 0,2-0,3 mm punktförmig, glänzend weiß
Tomatensaft-Agar		Ø 0,5-2 mm glänzend, gewölbt weiß	Ø 1-3 mm glänzend, flach rötlich
APT-Agar	Ø 0,2-0,5 mm punktförmig rötlich	Ø 3 mm schleimig, ineinander- hängend, glänzend	Ø 2-3 mm glänzend, gewölbt rötlich
Eugon-Agar	Ø 0,5-2 mm Mitte gewölbt, Rand flach, weiß	Ø 2-3 mm ineinanderhängend weiß	Ø 0,5-1 mm tropfenartig, glänzend durchscheinend
YN 6-Medium	Ø 0,5 mm flach, rund hellblau	Ø 0,2-5 mm polymorph, glänzend hellblau	Ø 1-2 mm glänzend mittelblau
Petueuly-Medium	Ø 0,2-0,5 mm flach, rund durchscheinend		
Sorbinsäure-Agar		Ø 3-4 mm glänzend, gewölbt weiß	Ø 2-3 mm glänzend, stark gewölbt weiß
Rogosa-Agar	Ø 0,5 mm durchscheinend, flach weiß	Ø 3-5 mm gewölbt, glänzend rund bis oval	Ø 3-4 mm gewölbt, glänzend weiß

7.3.2. Qualitative Ergebnisse - Koloniemorphologie von Laktobazillen

Da die Unterscheidung von Laktobazillen und Bifidobakterien anhand des Nährstoffbedarfs und der mikroskopischen Eigenschaften schwierig ist, wird in Tab.12 die Koloniemorphologie verschiedener Laktobazillenarten auf den neun getesteten Nährböden beschrieben.

7.4. Ergebnisse der Untersuchung von Arzneispezialitäten und Joghurtzubereitungen

Die Eignung der Nährböden und Versuchsbedingungen für die Zählung der Bifidobakterien und Laktobazillen wurde zuerst an einer Reihe von Arzneimitteln und Diätetika geprüft.

Im folgenden werden die qualitativen und quantitativen Ergebnisse bei der Untersuchung der einzelnen Präparate aufgeführt. Die Versuche wurden bei den Arzneispezialitäten zweimal, bei den Joghurts einmal durchgeführt.

7.4.1. Arzneispezialitäten

7.4.1.1. Ribolac^R

Ribolac^R enthält als einzigen mikrobiellen Bestandteil *Lactobacillus acidophilus*.

Die Laktobazillen wuchsen auf allen Nährböden außer Petuely. Es traten zwei sehr unterschiedliche Kolonieformen auf: kleine, flache, farblose Kolonien und große, schleimige, gewölbte, weiße Kolonien. Beide erwiesen sich bei der Untersuchung mit API 50 CH als Laktobazillen, sie wiesen jedoch erhebliche Abweichungen vom Kohlenhydratfermentationsschema des *Lactobacillus acidophilus* auf.

7.4.1.2. Omniflora^R

Omniflora^R enthält *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus* und *Bifidobacterium bifidum*.

Escherichia coli ließ sich auf den Nährböden Blut, Milch, Tomaten, APT und Eugon anzüchten, dies entspricht dem Verhalten der Teststämme (7.3.1). Auf YN 6 und Petuely wuchsen lediglich *Bifidobakterien*, auf Sorbinsäure ließen sich nur *Laktobazillen* nachweisen.

Laktobazillen und *Bifidobakterien* waren an der Kolonieform leicht zu unterscheiden. *Bifidobakterien* zeigten auf allen Nährböden eine stark kugelige Form und waren glänzend-weiß, auf Rogosa bräunlich; lediglich auf Petuely und YN 6 wuchsen sie als kleine, durchscheinende Kolonien, Die Kolonieform der *Laktobazillen* war stets flach, mit matter, körniger Oberfläche und gefranstem Rand.

7.4.1.3. Döderlein Med^R

Döderlein Med^R enthält als einzigen mikrobiellen Bestandteil *Lactobacillus acidophilus*.

Die *Laktobazillen* wuchsen auf allen Nährböden mit Ausnahme von Petuely. Die Kolonieform war flach, auf einigen Nährböden glänzend, auf anderen matt.

7.4.1.4. DE Medinova^R

DE Medinova^R enthält ebenfalls als einzigen mikrobiellen Bestandteil *Lactobacillus acidophilus*.

Die *Laktobazillen* wuchsen nicht auf YN 6 und Petuely. Morphologisch traten bei beiden Versuchsdurchgängen zwei Varianten auf: große, flache, farblose Kolonien mit matter Oberfläche und gelapptem Rand, sowie kleine, weiße, glänzende, gewölbte

Kolonien. Beide Varianten wuchsen teilweise übereinander, wobei kleine Kolonien auf den großen aufsaßen.

7.4.1.5. Eugalan^R

Die in Eugalan^R als einziger mikrobieller Bestandteil enthaltenen Bifidobakterien wuchsen auf allen Nährböden. Die Kolonieform schwankte zwischen stark gewölbten, glänzenden und flachen, matten Kolonien.

7.4.1.6. Quantitative Aspekte

Wie die Tab.13 zeigt, konnte die deklarierte Keimzahl mit dem beschriebenen Verfahren in der Regel gut nachgewiesen werden.

7.4.2. Joghurtzubereitungen

7.4.2.1. Biodyn Trinkjoghurt

Biodyn Trinkjoghurt wird mit Hilfe von Biogarde^R Kulturen hergestellt, sie setzen sich aus *B. bifidum*, *L. acidophilus* und *S. thermophilus* zusammen (58).

Auf den neun getesteten Nährböden ließen sich jeweils nur eine oder zwei der genannten Spezies gleichzeitig anzüchten. Bifidobakterien wuchsen lediglich auf Milch, Eugon und Petuely. Auf Rogosa traten nur Laktobazillen auf. In höheren Konzentrationen fanden sich auf Tomatensaft Mischformen, die mikroskopisch Laktobazillen, Streptokokken und Bifidobakterien enthielten.

Auf Petuely wuchsen neben Bifidobakterien auch Laktobazillen; ab Verdünnung 10^{-3} ließen sich allerdings nur noch Bifidobakterien nachweisen.

Die Kolonieform bei den Bifidobakterien aus Biodyn^R variierte zwischen flachen und gewölbten mittelgroßen, glänzenden Kolonieförmern.

7.4.2.2. Bifighurt

Bifighurt enthält nach Kurmann (93) *B. bifidum* und *S. thermophilus*.

Auf YN 6 ließ sich keine der beiden Spezies anzüchten, während auf Blut nur die Bifidobakterien nicht wuchsen.

Bifidobakterien erschienen als große, glänzende Kolonien von teils flacher, teils gewölbter Form; Streptokokken wuchsen als kleine, weiße, gewölbte Kolonien.

7.4.2.3. BA aktiv

BA aktiv enthält *B. longum* (89). Daneben wurden Streptokokken nachgewiesen.

Das Wachstum der enthaltenen Bakterien erwies sich mit dem oben genannten Verfahren als sehr unregelmäßig. Auf Platten, die mit einer Suspension höherer Konzentration beimpft waren, erschienen oft weniger Kolonien als auf Platten, auf denen eine niedriger konzentrierte Suspension ausgespatelt worden war; oft blieb das Wachstum auch ganz aus.

Die Bifidobakterien wuchsen als mittelgroße glänzende, teils gewölbte Kolonien. Mikroskopisch ließen sich langgezogene, wenig verzweigte Stäbchen nachweisen.

7.4.2.4. Quantitative Aspekte

Kurmann (93) fordert für fermentierte Milchprodukte eine Gesamtkeimzahl von 10^6 / ml zum Zeitpunkt des Verzehrs.

Die nachgewiesenen Gesamtkeimzahlen entsprechen dieser Forderung.

Die Nährböden scheinen also quantitativ sinnvolle Aussagen zur Gesamtkeimzahl zu erlauben. Allerdings lassen sich Bifidobakterien aus Sauermilchprodukten nicht regelmäßig auf den untersuchten Nährmedien anzüchten.

Tab.14 zeigt die quantitativen Ergebnisse des Versuchs.

7.5. Ergebnisse der Untersuchung zur Tauglichkeit der Nährböden zum quantitativen Nachweis von Bifidobakterien aus Speichel

In den Speichelproben konnten Bifidobakterien nicht nachgewiesen werden.

Als Ursache könnte die Art der Probenentnahme eine Rolle spielen.

Da keine unverdünnte Suspension ausgespatelt wurde, läßt sich außerdem vermuten, daß bereits in der am stärksten konzentrierten Suspension ($1 : 10^1$ verdünnt) keine Bifidobakterien mehr vorhanden waren.

Während Bifidobakterien aus der Plaque regelmäßig isoliert werden können (45), liegen zu ihrem Vorkommen im Speichel keine eindeutigen Untersuchungen vor.

Die in der Mundhöhle am häufigsten vorkommende Spezies, *Bifidobacterium dentium*, zeigte sich bei den vorangehenden Versuchen als besonders stark schwankend in Bezug auf ihre Wachstumsrate (7.2.1).

	<u>Omniflora</u> ^R	<u>Eugalan</u> ^R	<u>DE Medinova</u> ^R	<u>Döderlein Med</u> ^R	<u>Ribolac</u> ^R
Keimzahl nach Angaben der Hersteller	keine Angaben *Bif + Lak	4,0 Bif	7,0 - 8,4 Lak	8,7 - 9,7 Lak	7,0 Lak
Blut	6,5 6,86	3,79	3,0 3,84	7,14 7,71	7,13 6,59
Milch	6,67 7,04	3,42	8,22 8,79	7,27 8,04	7,19 6,96
Tomaten	6,40 6,17	3,42	7,74 7,84	7,18 7,59	7,07 6,38
APT	6,43 6,45	3,85	8,46 8,16	7,80 7,85	6,60 6,77
Eugon	6,72 6,40	3,86	8,67 8,60	7,21 7,66	6,82 6,55
YN 6	6,52 -	3,06	- -	6,98 8,04	6,36 5,53
Petuely	6,50 -	3,34	- -	- -	- -
Sorbinsäure	- 6,28	3,32	8,36 8,99	7,72 8,44	7,18 6,97
Rogosa	6,11 5,95	3,50	8,32 9,53	7,77 7,70	7,08 6,81

* Bif = Bifidobakterien; Lak = Laktobazillen

Tab.14: Bifidobakterienzahlen und Gesamtkeimzahlen ($\log_{10}$) aus fermentierten Milchprodukten

	<u>Biodyn Trinkjoghurt</u>		<u>Bifighurt</u>		<u>BA aktiv</u>	
	Bifidobakterien/ ml Joghurt	Gesamtkeim- zahl/ml Jogh.	Bifidobakterien/ ml Joghurt	Gesamtkeim- zahl/ g Jogh.	Bifidobakterien/ ml Joghurt	Gesamtkeim- zahl/ g Jogh.
Blut	-	7,20	-	7,73	8,31	8,51
Milch	7,38	8,21	8,03	8,38	8,87	8,87
Tomaten	-	7,92	7,27	7,41	9,60	9,75
APT	-	7,81	6,58	7,50	11,20	11,40
Eugon	6,29	7,78	5,92	7,51	8,28	8,94
YN 6	-	6,26	-	-	-	-
Petuely	5,46	5,47	5,00	6,79	-	-
Sorbinsäure	-	7,86	5,93	7,69	4,41	4,41
Rogosa	-	6,49	5,32	6,62	7,27	7,66

7.6. Ergebnisse der Untersuchung zur Tauglichkeit der Nährböden zum quantitativen Nachweis von Bifidobakterien aus dem Stuhl

Tab.15 zeigt die Bifidobakterienzahlen auf den neun untersuchten Nährböden. In Tab.16 sind die Ergebnisse der Identifizierung von grampositiven anaeroben Stäbchen in den Stuhlproben 9 bis 11 zusammengestellt. Tab.17 zeigt die Ergebnisse bei der mikroskopischen Untersuchung der Proben 2,6 und 8; bei diesen drei Proben waren Bifidobakterien auf der überwiegenden Zahl der Nährböden angewachsen.

Eine tabellarische Darstellung der Ergebnisse und quantitative Aussagen sind nur in sehr eingeschränktem Maße möglich. Die individuelle Zusammensetzung der Darmflora läßt es auch nicht zu, bestimmte Zahlen zu erwarten, mit denen die tabellarischen Resultate verglichen werden könnten. Insgesamt lagen die Zahlen jedoch unter den erwarteten und von anderen Autoren und aus dem eigenen Laboratorium ermittelten Werten.

Erschwert werden die quantitativen Aussagen ferner dadurch, daß die Kultur von Bifidobakterien aus dem Stuhl nur auf einem Teil der Nährböden möglich war. Die Eignung der einzelnen Nährböden für den quantitativen Nachweis von Bifidobakterien schwankte von Probe zu Probe.

Im folgenden werden die Befunde bei den einzelnen Proben skizziert. Bei den Proben 9 bis 11 wurden die anaeroben grampositiven Stäbchen eingehender differenziert.

Probe 1: Bifidobakterien wuchsen auf Tomaten, Petuely, Sorbinsäure und Rogosa. Auf YN 6 und APT waren nur Kokken nachweisbar, auf Blut Kokken und gramnegative Stäbchen. Auf Sorbinsäure und Rogosa wuchsen neben Bifidobakterien grampositive Kokken. Bei dieser Probe ließen sich Bifidobakterien an ihrer typischen gewölbten Form gut erkennen; sie wuchsen als

große Kolonien.

Probe 2: Bifidobakterien konnten auf allen Nährböden außer Blut und Eugon gefunden werden. Neben Bifidobakterien wuchsen massenhaft gramnegative Stäbchen, auf Milch und Tomaten auch Kokken. Als gut zählbare Kolonien wuchsen Bifidobakterien auf Sorbinsäure, Rogosa, APT und Eugon. Auf Petuely traten zwei Kolonieformen auf; gewölbte, mittelgroße, gelbliche Kolonien und durchscheinende kleine Kolonien.

Probe 3: Bifidobakterien wuchsen nur auf Eugon und Sorbinsäure, auf dem Sorbinsäure-Agar zusammen mit gramnegativen Stäbchen. Grampositive Kokken waren aus diesem Stuhl in besonders hoher Zahl nachzuweisen, besonders auf Rogosa.

Probe 4: Auf Milch, Eugon, Petuely, Sorbinsäure und Rogosa konnten Bifidobakterien gezüchtet werden. Auf den Nährböden wurden neben Bifidobakterien noch Kokken und gramnegative Stäbchen gefunden, auf Sorbinsäure wuchsen außerdem Laktobazillen. Auf den Nährböden Sorbinsäure und Rogosa traten Bifidobakterien als große, gewölbte, weiße Kolonien auf; Laktobazillen wuchsen als flache, matte Kolonien.

Probe 5: Bifidobakterien wuchsen auf Eugon, Sorbinsäure und Rogosa. Auf Rogosa war bei dieser Probe ein selektives Wachstum von Bifidobakterien gewährleistet. Die Kolonien waren in charakteristischer Weise gewölbt mit glänzender Oberfläche.; auf Rogosa traten daneben flache Kolonien von Bifidobakterien auf.

Probe 6: Auf Milch, Tomaten, Eugon, Sorbinsäure und Rogosa waren Bifidobakterien nachweisbar. Auf Sorbinsäure wuchs neben Bifidobakterien lediglich eine Spezies

gramnegativer Stäbchen, auf Rogosa war die Begleitflora vollständig gehemmt. Zwei Varianten der Kolonieforn traten auf Rogosa auf; es wuchsen kleine, stark pigmentierte und größere, schwach pigmentierte Kolonien.

Probe 7: Bifidobakterien ließen sich auf Petuely, Sorbinsäure und Rogosa anzüchten. In diesem Stuhl waren Fusobakterien und Kokken in besonders hoher Anzahl nachweisbar. Auf Petuely wuchs neben Bifidobakterien nur eine Spezies gramnegativer Stäbchen. Es traten auf diesem Nährboden bei den Bifidobakterien zwei Koloniefornen auf; mittelgroße, gewölbte, gelbliche und kleine, gewölbte, durchscheinende Kolonien. Auf Rogosa wuchsen Bifidobakterien als große, gewölbte, weiße oder als große, gewölbte, gelbliche Kolonien.

Probe 8: Bifidobakterien wuchsen auf Milch, Tomaten, APT, Sorbinsäure und Rogosa. Lediglich auf Rogosa trat neben den Bifidobakterien nur eine einzige andere Spezies in Erscheinung, nämlich gramnegative Stäbchen.

Probe 9: Auf den Nährböden APT, Sorbinsäure und Rogosa ließen sich Bifidobakterien anzüchten, wobei das Wachstum auf Eugon besonders üppig war. Auf allen drei Nährböden wuchsen daneben grampositive Kokken. Auf Sorbinsäure und Rogosa ließen sich neben Bifidobakterien auch Laktobazillen nachweisen, auf APT wuchsen Eubakterien.

Probe 10: Bei dieser Probe konnten Bifidobakterien nur auf Rogosa gezüchtet werden; ihre Wachstumsrate war auch auf diesem Nährboden gering. Neben Bifidobakterien traten Laktobazillen und grampositive Kokken

auf Rogosa auf. Auf Sorbinsäure wuchsen nur Laktobazillen und Kokken.

Probe 11: Bifidobakterien wuchsen auf Milch, Eugon, Sorbinsäure und Rogosa. Auf allen vier Nährböden traten sie als gewölbte, glänzende, weiß pigmentierte Kolonien in Erscheinung. Laktobazillen, die auf Sorbinsäure und Rogosa ebenfalls wuchsen, unterschieden sich durch ihre flache, matte Kolonieform von den Bifidobakterien; auf Sorbinsäure und Rogosa wuchsen daneben ferner Kokken. Auf Eugon ließen sich als weitere anaerobe, grampositive Stäbchen Eubakterien nachweisen.

7.7. Ergebnisse der Untersuchung zur Tauglichkeit der Nährböden für den quantitativen Nachweis von Bifidobakterien aus dem Vaginalsekret

Bifidobakterien wurden nur in drei der insgesamt elf Proben von Vaginalsekret nachgewiesen, und zwar ausschließlich auf Petuely. So erübrigt sich die Darstellung der Ergebnisse in einer Tabelle.

Die Zahl der Bifidobakterien lag zwischen 2,0 und 4,4 ($\log_{10}$). Die Kolonien waren klein bis mittelgroß und gewölbt. Petuely-Agar war in zwei der drei Proben für Bifidobakterien selektiv. In der dritten Probe wuchsen Bifidobakterien neben Laktobazillen, wobei die Zahl der Laktobazillen höher lag als diejenige der Bifidobakterien. Im Vaginalsekret der beiden schwangeren Probandinnen konnten keine Bifidobakterien nachgewiesen werden.

Laktobazillen wuchsen bei allen Proben und auf sämtlichen Nährböden in Mengen von 4,5 bis 9,0 ($\log_{10}$), wobei die höchsten Keimzahlen auf APT und Sorbinsäure auftraten. Morphologisch waren bei den Laktobazillen Schwankungen von kleinen, punktförmigen bis zu großen, flachen Kolonien anzutreffen.

Neben Laktobazillen und Bifidobakterien wurden lediglich bei einer Probe auf YN 6 und Eugon Kokken nachgewiesen; andere Spezies traten nicht auf.

Tab.15: Bifidobakterienzahlen ($\log_{10}$) in Stuhlproben

Stuhlprobe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Blut	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Milch	-	8,53	-	8,51	-	9,00	-	8,60	-	-	8,20
Tomaten	8,39	8,52	-	-	-	9,08	-	8,00	-	-	-
APT	-	8,48	-	-	-	-	-	8,30	10,95	-	-
Eugon	-	-	8,01	8,58	8,00	8,78	-	-	-	-	-
YN 6	-	9,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Petuely	8,62	9,20	-	-	-	-	8,3	-	-	-	-
Sorbinsäure	8,06	8,10	7,53	8,91	8,30	8,44	7,72	7,83	8,08	-	6,60
Rogosa	8,82	8,65	-	9,16	8,70	7,95	7,30	8,18	8,91	6,54	7,94

Tab.16: Zahl der anaeroben grampositiven Stäbchen ($\log_{10}$) in Stuhlproben

Bifidobakterien Laktobazillen

Eubakterien

Stuhlprobe	9	10	11	9	10	11	9	10	11
Blut	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Milch	-	-	8,20	-	-	-	7,30	-	-
Tomaten	-	-	-	-	8,85	6,70	8,60	7,48	7,65
APT	10,95	-	-	-	9,70	-	10,95	-	8,00
Eugon	-	-	8,48	-	-	-	8,48	-	9,18
YN 6	-	-	-	-	-	8,78	9,34	-	8,78
Petuely	-	-	-	-	-	-	8,85	7,72	-
Sorbinsäure	8,08	-	6,60	6,60	8,81	7,00	-	-	-
Rogosa	8,91	6,54	7,94	6,95	6,72	7,23	-	-	7,85

Tab. 17

Zahl der neben den Bifidobakterien gewachsenen Bakteriengruppen ($\log_{10}$) nach biochemischer Differenzierung

	Probe 2:				Probe 6:				Probe 8:			
	Bifido- bakterien	Gram + Stäbchen	Gram - Stäbchen	Gram + Kokken	Bifido- bakterien	Gram + Stäbchen	Gram - Stäbchen	Gram + Kokken	Bifido- bakterien	Gram + Stäbchen	Gram - Stäbchen	Gram + Kokken
Milch	8,53	-	8,47	6,70	9,00	9,78	9,83	-	8,60	-	7,30	-
Tomaten	8,52	-	8,36	6,30	9,08	-	10,08	-	8,00	-	7,69	8,11
APT	8,48	6,30	8,50	-	-	9,08	9,94	-	8,30	-	6,69	-
Eugon	-	8,93	9,16	-	8,78	9,36	9,78	-	-	-	8,60	9,64
YN 6	9,65	8,30	9,20	-	-	10,40	10,08	-	-	6,30	8,48	-
Petuely	9,20	-	9,30	-	-	9,56	-	-	-	7,30	-	-
Sorbinsäure	8,10	6,90	8,00	-	8,44	-	8,48	-	7,83	-	7,68	-
Rogosa	8,65	-	8,57	-	7,95	-	-	-	8,18	-	7,90	-

8. Diskussion

8.1. Prinzipielle Überlegungen

Die selektive Züchtung von Bakterien, die an ähnlichen Standorten auftreten und deren Nährstoffbedarf und Wachstumsbedingungen fast identisch sind, gestaltet sich stets als schwierig. Bei den Bifidobakterien gilt dies für die Abgrenzung einer Anzahl von Gattungen wie *Lactobacillus*, *Eubacterium* und *Streptococcus*. Da die Bifidobakterien zu den verhältnismäßig langsam wachsenden Arten zählen, sind sie besonders schwer selektiv anzüchtbar.

Wenn die Spezies zusätzlich mikroskopisch große Ähnlichkeit aufweisen und ihre Stoffwechselprodukte weitgehend identisch sind, wie dies bei Laktobazillen und Bifidobakterien der Fall ist, wird der selektive Nachweis noch zusätzlich erschwert.

Die lebensmitteltechnologisch interessanteren Laktobazillen wurden bisher eingehender untersucht als die Bifidobakterien, welche erst in jüngster Zeit als Bestandteile von Arzneispezialitäten und diätetischen Lebensmitteln zum Einsatz kommen und pathogenetisch keine wesentliche Rolle spielen. So sind im Handel mehrere Fertignährböden erhältlich, die für die selektive Kultur von Laktobazillen empfohlen werden; Bifidobakterien werden zumeist gar nicht erwähnt.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit sich derartige Laktobazillen-Fertignährböden auch für Bifidobakterien eignen und inwiefern sich Bifidobakterien und Laktobazillen auf den einzelnen Medien und aus unterschiedlichem Untersuchungsmaterial selektiv anzüchten oder zumindest morphologisch unterscheiden lassen. Um die Selektivität gegenüber Bakterien zu untersuchen, die aufgrund ökologischer Gegenbenheiten oft gemeinsam mit Bifidobakterien auftreten, wurden Versuche mit entsprechenden Einzelstämmen durchgeführt.

Es sollte ferner festgestellt werden, ob eine selektive Züchtung von Bifidobakterien aus Arzneispezialitäten, Sauermilchprodukten, Speichel, Stuhl und Vaginalsekret auf ausgewählten, der Literatur entnommenen Spezialnährböden für Bifidobakterien möglich ist und ob diese den einfachen Fertignährböden überlegen sind.

Um die Eignung der Nährböden für eine optimale Wachstumsförderung für Bifidobakterien festzustellen, wurde außerdem eine Reihe von festen Nährmedien ohne Selektivstoffe untersucht. Dabei handelte es sich wiederum einerseits um Fertignährböden, andererseits um speziell für Bifidobakterien, gelegentlich auch für Laktobazillen entwickelte Nährböden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung können nur in beschränktem Umfang vergleichend diskutiert werden; Studien ähnlicher Breite liegen nicht vor.

BOVENTER, der im Jahre 1949 umfangreiche Studien zu *B. bifidum* und seinen Wachstumsbedingungen veröffentlichte (16), hatte sich insbesondere mit den Bifidobakterien aus Stuhlproben beschäftigt. Der Einsatz von Bifidobakterien in pharmazeutischen Produkten und Sauermilcherzeugnissen war damals noch nicht üblich; Bifidobakterien spielen hier erst in jüngerer Zeit eine Rolle. Selektive Nährböden werden in der Veröffentlichung nicht beschrieben; auch quantitative Untersuchungsergebnisse werden nicht genannt.

REUTER führte 1969 Untersuchungen zum Bakteriengehalt von verschiedenen Arzneispezialitäten durch, deren mikrobielle Bestandteile Laktobazillen und Bifidobakterien waren (96). Konkrete Angaben darüber, welcher Nährboden verwendet wurde, sind in der Arbeit nicht enthalten. Allerdings verweist REUTER auf seine früheren Untersuchungen (95), in denen er verschiedene Nährböden für Laktobazillen untersucht und damit die Basis für den handelsüblichen Sorbinsäure-Agar geschaffen hatte. Man

kann also annehmen, daß die Wachstumsbedingungen in REUTERS Studie ähnlich waren wie auf dem in der vorliegenden Studie verwendeten Sorbinsäure-Agar.

RESNICK und LEVIN (59) verglichen 1984 den von ihnen entwickelten YN 6-Agar lediglich mit dem Medium nach GYLLENBERG und NIEMELÄ (91), das keine Peptone, aber verschiedene Aminosäuren, Vitamine und Mineralstoffe, sowie Tween 80 enthält. Sie untersuchten Silage, Stuhl und Wasser. Die Ergebnisse dieser Untersuchung lassen sich mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werten nicht vergleichen. RESNICK und LEVIN geben die prozentuale Recovery an und erläutern nicht, auf welches Untersuchungsmaterial sich die Werte beziehen.

RAŠIĆ und KURMANN führen in ihrem 1983 erschienenen Buch "Bifidobacteria and Their Role" eine Reihe von selektiven, vor allem jedoch nichtselektiven Nährböden für Bifidobakterien an. Zur Auswahl der Nährböden heißt es im Text: "There is no optimal selective culture medium for the various materials examined." (58).

Inwieweit Nährböden für die selektive Züchtung von Bifidobakterien aus fermentierten Milchprodukten, wie sie von SHIMADA und Mitarbeitern (97) bzw. anderen japanischen Forschern entwickelt wurden, anhand vergleichender Untersuchungen geprüft wurden, ließ sich nicht ermitteln. Es liegen zumeist in englischer Sprache nur Zusammenfassungen vor, während das Originalschrifttum auf japanisch abgefaßt ist.

8.2. Vorversuche zur Methodik

Bifidobakterien sind obligat anaerobe Mikroorganismen; die Ergebnisse des kulturellen Nachweises werden deshalb ganz wesentlich von den anaeroben Züchtungsverfahren beeinflusst. Dieser Einfluß wurde in den Studien, die in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben sind, bisher kaum berücksichtigt. Lediglich RESNICK und LEVIN (60) haben bei der Untersuchung von Silage die Tauglichkeit der Inkubation in einem Anaerobenschrank (Soft-type glove box, Coy Laboratory Ann Arbor, Mich.) und in Anaerobentöpfen nach dem GASPAC Verfahren (BBL) geprüft. Die Ergebnisse für die Recovery von Bifidobakterien waren mit beiden Verfahren gleich gut.

Dagegen erwies sich die Inkubation mit dem GASPAC System in der vorliegenden Studie als nicht besonders leistungsfähig. Die Ergebnisse der einzelnen Versuche wichen zu stark voneinander ab; einzelne Stämme wuchsen nicht. Die Gründe hierfür könnten in der Zusammensetzung des Gasgemisches zu suchen sein. Möglicherweise waren aber auch vorbereitende Arbeitsgänge die Ursache ; bei einem Teil der Vorversuche wurden die vorbereitenden Arbeiten unter strömendem CO_2 vorgenommen, bei dem anderen Teil der Vorversuche wurden sie im Anaerobenschrank (Anaerobic System Forma Scientific Model 1024) durchgeführt. Bei größeren Versuchsreihen erwies sich das GASPAC System als zu langwierig und umständlich.

Konstante Resultate ließen sich in der vorliegenden Untersuchung erreichen, wenn die beimpften Platten in große Metallgefäße mit einem luftdichten Deckelverschluß (Whitley) gebracht wurden und die anaerobe Atmosphäre mit Hilfe des Anaerocult Systems oder durch 15-minütige Füllung mit einem Gasgemisch (N_2 85 %, H_2 10 %, CO_2 5 %) erzeugt wurde und ein Katalysator Deoxo D (Heraeus) verwendet wurde.

Am besten bewährte sich eine Bebrütungszeit von vier Tagen. Zwar werden die Kolonien im allgemeinen schon nach ein bis

zwei Tagen sichtbar, wie auch BOVENTER (16) beobachtet hatte, doch trat sichtbares Wachstum manchmal auch erst nach drei Tagen auf. RAŠIĆ und KURMANN (58) empfehlen eine Inkubationszeit von mindestens zwei Tagen. In der vorliegenden Studie waren die Ergebnisse nach vier Tagen am besten abzulesen; diese Bebrütungsdauer wurde deshalb in allen Versuchen eingehalten und wird für den Nachweis der Bifidobakterien generell empfohlen.

Grundsätzlich sollen alle Arbeitsgänge wie das Suspendieren und Verdünnen der Kulturen und Proben unter strikt anaeroben Bedingungen, also unter strömendem CO₂ oder in einer Anaerobenkammer ausgeführt werden. Störungen und Nachlässigkeiten bewirken fast immer eine schlechtere Ausbeute. Alle Versuche zu dieser Fragestellung wurden zwar mit Laborstämmen vorgenommen; es gibt jedoch keinen Grund, für Bifidobakterien aus biologischem Material eine höhere Aerotoleranz anzunehmen.

Die Einhaltung einer zuverlässig anaeroben Arbeitstechnik gehört zu den wichtigsten Voraussetzungen, wenn Bifidobakterien mit einer annähernd standardisierten Methodik quantitativ bestimmt werden sollen.

8.3. Eignung der nichtselektiven und selektiven Nährböden zum quantitativen Nachweis von Bifidobakterien

Bei den für die Züchtung von Bifidobakterien geeigneten oder speziell konzipierten Nährböden sind grundsätzlich nichtselektive und selektive Medien zu unterscheiden. Zu den nichtselektiven Medien gehören Standardnährböden, die in der medizinischen Mikrobiologie für viele Zwecke benutzt werden wie der Blutagar. Es zählen dazu jedoch auch Nährböden, die für die besonderen Ansprüche der Bifidobakterien entwickelt wurden, aber keine selektiven Eigenschaften besitzen, so daß enger verwandte Bakteriengruppen wie Laktobazillen, Eubakterien und Streptokokken oder entsprechend der bakteriologischen

Systematik völlig fremde Bakterien wie Staphylokokken, Enterobakterien und Pseudomonaden ebenfalls anwachsen.

Nichtselektive Nährböden versprechen im allgemeinen bessere nutritive Bedingungen, die sich in Form einer höheren Recovery der eingesetzten Organismen äußern sollte. Andererseits gelingt die quantitative Bestimmung der Bifidobakterien auf solchen Medien nicht, wenn andere Bakterienarten in größerer Zahl vorhanden sind und sich die Kolonieformen der Bifidobakterien und der anderen Arten nicht deutlich unterscheiden. Die nichtselektiven Nährböden sind deshalb nur in Fällen zu gebrauchen, wo Bifidobakterien allein auftreten oder wenigstens zahlenmäßig dominieren, also beispielsweise in Arzneispezialitäten oder Sauermilcherzeugnissen.

Die selektiven Nährböden unterdrücken ganz oder teilweise das Wachstum der nicht enger verwandten Bakterienarten; im Idealfall lassen sie ausschließlich die Vermehrung der Bifidobakterien zu. Mit der Selektion ist häufig ein schlechteres Wachstum und eine geringere Ausbeute auch bei den gesuchten Spezies in Kauf zu nehmen.

Von den für die Zählung von Bifidobakterien entwickelten Nährmedien werden in dieser Studie nur die Agarmedien untersucht; flüssige Nährböden werden also ausgeschlossen. Die Rezepturen sind vielfältig: Sie reichen von sehr komplexen und nur mit großem Aufwand herstellbaren Kompositionen wie bei den Nährböden nach Petuely und nach Ochi bis zu einfachen wie beispielsweise Rogosa-Agar. Einige dieser Nährböden werden als fertig gemischte Pulver, die nur noch aufgekocht und sterilisiert werden müssen, im Handel angeboten.

Für praktische Belange ist ein billiger Nährboden am besten geeignet, der einfach und schnell zubereitet werden kann und dennoch gutes Wachstum und Selektivität zeigt.

Der Leber-Zystein-Milchzucker-Agar nach BLAUROCK wurde lange

Zeit hindurch als besonders gut geeignet für Bifidobakterien bezeichnet (18,58). BOVENTER stellte 1949 fest, daß sich der Nährboden von allen bekannten Medien am besten für die Kultur von Bifidobakterien aus Säuglingsstühlen eignet; BOVENTER beschrieb charakteristische große, weißglänzende Kolonien (16). In der vorliegenden Studie zeigte der Nährboden keine überdurchschnittlich guten Eigenschaften. Die Wachstumsrate für Bifidobakterien war verhältnismäßig hoch; die Kolonieform erschien jedoch bei einem Teil der Stämme als uncharakteristisch und schlecht zählbar. Auch RAYNAUD (94) beschrieb unregelmäßige Kolonieformen der Bifidobakterien auf dem Nährboden nach BLAUROCK.

In Bergey's Manual (13) wird für die Kultur von Bifidobakterien das TPY-Medium empfohlen; Das Tryptikase-Phyton-Glukose-Medium, das die ATCC empfiehlt und welches in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, ist fast identisch mit dem TPY-Medium. Auf diesem Nährboden wuchsen Bifidobakterien reichlich und waren gut zählbar; ihre Form war allerdings wenig charakteristisch. Der Nährboden enthält keine Selektivstoffe. Somit konnte kein Vorteil gegenüber einfachen Fertignährböden festgestellt werden.

Der PYST-Nährboden nach KOTARSKI und SAVAGE, der als Kohlenhydrat Saccharose enthält, wurde im letzten Jahrzehnt für die Kultur von Laktobazillen verwendet, also zu einer Zeit, wo die unterschiedlichen Eigenschaften von Laktobazillen und Bifidobakterien bereits hinlänglich bekannt waren. Auch Bifidobakterien wuchsen auf diesem Nährboden gut. Die Wachstumsraten lagen allerdings nahezu bei allen Bifidobakterienstämmen niedriger als auf den übrigen Nährböden; die Bifidobakterien wuchsen als kleine, punktförmige Kolonien. Dieser Nährboden ist also möglicherweise tatsächlich eher für Laktobazillen geeignet; Bifidobakterien werden zwar nicht gehemmt, in ihrem Wachstum aber auch nicht sonderlich gefördert.

Der nichtselektive Fleisch-Hefe-Agar nach BEERENS (VL) wird von RASÍČ und KURMANN (58) als ein Basismedium für die Kultur von Bifidobakterien bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit wuchsen die Bifidobakterien auf dem Nährboden gut; die Kolonienform erwies sich allerdings als sehr unterschiedlich und insgesamt als wenig charakteristisch für die Gattung. Die Wachstumsrate war nicht besser als auf den in Pulverform erhältlichen Nährsubstraten.

Der Nährboden nach OCHI erfordert für seine Herstellung besonderen Aufwand. Er enthält viele Einzelkomponenten, als Wachstumsstoffe sind Mangan- und Magnesiumsalze, Hefeextrakt und Tween 80 zugesetzt. Eine qualitative Auswertung war auf diesem Nährboden gut möglich; die schleimigen, charakteristisch weiß bis rötlich gefärbten Kolonien ließen sich leicht erkennen. Allerdings lag die Wachstumsrate bei durchschnittlichen bis niedrigen Werten. Da auch auf anderen einfacher zusammengesetzten Nährmedien wie dem Eugon-Agar die Kolonien qualitativ gut auswertbar waren, ließ sich ein deutlicher Vorteil dieses komplizierten Nährbodens nicht erkennen. Angesichts dieser Beobachtungen erscheint es nicht sinnvoll, dem Nährboden den selektive Stoffe zuzugeben, wie dies von TERAGUCHI und Mitarbeitern (77) vorgeschlagen wurde.

Die oben beschriebenen Nährböden Blaurock, TPG, PYST, VL und Ochi sind nichtselektive Medien mit relativ aufwendiger Herstellung, die gegenüber den handelsüblichen Nährböden keine nennenswerten Vorteile bieten. Daher wurden sie nur für die Untersuchung der Bifidobakterienstämme verwendet. Es wurden also weder Versuche zur Selektivität noch Untersuchungen von biologischem Material, Arzneispezialitäten und fermentierten Milchprodukten auf diesen Nährböden vorgenommen.

Dagegen wurden die im folgenden beschriebenen Nährböden in allen Versuchsreihen untersucht. Zur Kontrolle wurde außerdem Blutagar bei allen Untersuchungen mitgeführt.

Auf Milch-Agar (Oxoid) wuchsen die Bifidobakterien gut, aber als winzige, unscheinbare Kolonien. Eine charakteristische Kolonieform war demnach nicht zu beobachten, was insofern als besonderer Nachteil anzusehen ist, als der Nährboden praktisch keine selektiven Eigenschaften gegenüber anderen Gattungen zeigte. Lediglich eine Anzahl von *Bacteroides* sp. wurde gehemmt. Als weiterer Nachteil muß die starke Streuung bei den Meßergebnissen angeführt werden, die bei einigen Stämmen wie *B. longum* und *B. magnum* besonders zutage trat.

Der Tomatensaft-Agar, der ursprünglich für die *L. acidophilus* und *L. bulgaricus* entwickelt worden war (40), eignete sich auch gut für die Kultur von Bifidobakterien. HOSATTE verwendete Tomatensaft-Agar für die Züchtung von *B. bifidum* aus dem Säuglingsstuhl (92). Verschiedene andere Autoren benutzten den Nährboden für die Kultur isolierter Stämme von Bifidobakterien (58). Auch in der vorliegenden Studie war Tomatensaft-Agar nur für die Züchtung einzelner Bifidobakterienstämme geeignet, denn so gut wie alle untersuchten Bakterienstämme anderer Gattungen zeigten ebenfalls üppiges Wachstum. Der hier verwendete Tomatensaft-Agar (Difco) erwies sich wegen seiner weichen Konsistenz für die Technik des Ausspatelns nicht als sonderlich günstig.

APT-Agar (All Purpose Media with Tween, Merck) wurde zunächst für den Nachweis von Laktobazillen aus Fleischprodukten entwickelt (28) und dient heute zur Bestimmung verschiedener Bakterien insbesondere aus Lebensmitteln. Bifidobakterien wuchsen als mittelgroße, gut zählbare, glänzende, schleimige Kolonien; die Keimzahlen lagen im mittleren Bereich. Der Nährboden zeigte keinerlei selektive Eigenschaften gegenüber anderen Bakterienarten.

Auf Eugon-Agar (BBL) zeigten Bifidobakterien, aber auch die meisten anderen Spezies gutes Wachstum; eine Anzahl von gramnegativen Stäbchen wurde gehemmt. Die Kolonien waren aufgrund ihrer großen, glänzenden, gewölbten Form gut zählbar und

leicht zu erkennen. WERNER reicherte den Eugon-Agar mit Blut an und verwendete das Medium für die Isolierung von Bifidobakterien aus der Mundhöhle (98). FINEGOLD gab Hefeextrakt und Hämin zum Eugon Agar und testete auf diesem Nährboden die Antibiotikaempfindlichkeit der Bifidobakterien(90). Für die Kultur einzelner Stämme erscheint eine Anreicherung des Nährbodens nicht als nötig, da Eugon Agar quantitativ und qualitativ gute Ergebnisse brachte.

Alle oben beschriebenen Nährböden erwiesen sich als geeignet für die Kultur von definierten Bifidobakterienstämmen. Die Wachstumsrate war auf allen Medien gut, beim Milch-Agar unterlag sie stärkeren Schwankungen. Bifidobakterien wuchsen am reichlichsten auf Eugon Agar. Besonders gut zählbare Kolonien erschienen auf Ochi, Eugon und APT. Eine selektive Komponente konnte bei den genannten Nährböden nicht in nennenswertem Umfang festgestellt werden.

Unter den nichtselektiven Nährböden erwies sich der Eugon Agar als besonders gut geeignet für die Züchtung der Bifidobakterien. Er ist im Handel erhältlich, leicht herzustellen und bietet sowohl eine hohe Wachstumsrate als auch charakteristische Kolonieförmigkeiten der Bifidobakterien.

Als Wachstumsstoffe für Bifidobakterien gelten N-Azetylglukosaminhaltige Saccharide und enzymhydrolysierte Proteine (58), für Laktobazillen werden Mangansalze als Wachstumsstoffe verwendet.

Mangansalze sind in den Nährböden APT, Rogosa, Sorbinsäure und Petuely enthalten.

N-Azetylglukosaminhaltige Saccharide (Bifidus Faktor I) sind im Milch-Agar in Form von Kuhmilch enthalten (58). In der vorliegenden Studie ließ sich allerdings keine besondere Überlegenheit des Milch-Agars feststellen, lediglich Bifidobakterien aus Sauermilchprodukten zeigten ein überdurchschnittlich gutes Wachstum.

Als Quellen für Bifidus Faktor II gelten durch Enzymhydrolyse gewonnene Peptone, Milch und Leberextrakte. Alle Nährböden außer Blut- und Petuely-Agar enthalten diese Wachststoffe.

Eine unterschiedliche Wachsförderung für Laktobazillen und Bifidobakterien ließ sich, insgesamt gesehen, bei keinem der verwendeten Nährböden beobachten.

Die verwendeten Hemmstoffe waren Neomycin(im YN 6-Agar),Sorbinsäure (im Sorbinsäure-Agar),Essigsäure (im Rogosa-Agar) und Nalidixinsäure (im Petuely-und YN 6-Agar). Die Säurezusätze ermöglichen ein üppiges und relativ selektives Wachstum von Bifidobakterien zusammen mit Laktobazillen aus den verschiedenen Untersuchungsmaterialien.

Obwohl YN 6-Agar 0,008 % Nalidixinsäure und 0,00025 % Neomycinsulfat enthält, zeigte der Nährboden keinerlei selektive Eigenschaften . Nalidixinsäure 0,01 % (im Petuely-Agar) bewirkte dagegen ein selektives Wachstum von Bifidobakterien; von den anderen anaerob wachsenden Stäbchen wuchsen praktisch nur die Eubakterien.

YN 6-Agar war für die Zählung von Bifidobakterien aus dem Abwasser entwickelt worden. Die untersuchten Bifidobakterienstämme wuchsen auf dem Nährboden gut. Eine charakteristische Kolonieform ließ sich allerdings nicht feststellen. Graue, hellblaue und dunkelblaue Kolonien verschiedener Form traten auf. Enterobakteriazeen, Clostridien und Streptokokken ließen sich auf dem Nährboden nicht anzüchten.

Auf Sorbinsäure-Agar (Merck) und Rogosa-Agar (Merck) wuchsen Bifidobakterien gut und in charakteristischer, leicht zählbarer Form. Eine Hemmwirkung wurde lediglich gegenüber Enterobakteriazeen und einigen Arten von Bacteroides beobachtet.

Auf Petuely-Agar war die Bifidobakterienzahl verhältnismäßig niedrig. Die wenig charakteristischen, meist kleinen, durch-

scheinenden Kolonien ließen sich oft nur schlecht zählen. Petuely-Agar zeigte allerdings eine selektive Wirkung gegenüber den meisten Stämmen anderer Gattungen, nur einige Bakteroides und Bacillus sp. wuchsen auf diesem Nährboden. Auch Laktobazillen wurden im Wachstum gehemmt.

Rogosa-Agar und Sorbinsäure-Agar sind in pulverisierter Form als Fertignährböden im Handel und damit einfach herzustellen und auch unkompliziert zu handhaben. YN 6-Agar muß nach Literaturangaben eingewogen und hergestellt werden; der Nährboden ist nur kurz haltbar. Petuely-Agar ist aus zahlreichen Einzelkomponenten zusammengesetzt; seine Herstellung nach dem Originalrezept ist sehr aufwendig. Der Nährboden ist besonders empfindlich gegenüber äußeren Einflüssen und nur kurze Zeit verwendbar.

8.4. Praktische Prüfung an verschiedenen Materialien

Diese Untersuchungen wurden mit den nichtselektiven Nährböden Blut, Milch, Tomaten, APT, Eugon und den selektiven Medien YN 6, Petuely, Sorbinsäure und Rogosa durchgeführt. Die Nährböden Blaurock, TPG, PYST, VL und Ochi wurden nicht untersucht, da sie kompliziert herzustellen sind und keine deutlichen Vorteile gegenüber Fertignährböden zeigen.

Es wurden Arzneispezialitäten und fermentierte Milchprodukte untersucht, um festzustellen, ob die Nährböden sich für die Züchtung von Bifidobakterien aus diesem Untersuchungsmaterial eignen, ob die Recovery für Bifidobakterien zufriedenstellend ist und ob sich Bifidobakterien und Laktobazillen ausreichend gut unterscheiden lassen.

Die untersuchten pharmazeutischen Präparate enthalten als deklarierten mikrobiellen Bestandteil entweder nur Bifidobakterien (Eugalan^R), nur Laktobazillen (Döderlein Med^R, DE Medinova^R, Ribolac^R) oder Bifidobakterien zusammen mit Laktobazillen und E. coli (Omniflora^R). Die getesteten Joghurts ent-

halten Bifidobakterien und Streptokokken (Bifighurt, BA aktiv) bzw. Bifidobakterien, Streptokokken und Laktobazillen (Biodyn). Es kommen also in den beiden genannten Untersuchungsmaterialien jeweils höchstens drei Spezies nebeneinander vor.

REUTER hatte bereits 1969 verschiedene Arzneispezialitäten auf ihren Gehalt an Laktobazillen und Bifidobakterien überprüft (96), darunter auch das Präparat Omniflora^R. Es zeigte sich, daß REUTERS Werte bei dieser Zubereitung etwa um eine logarithmische Dekade höher lagen als die in der vorliegenden Studie ermittelten Zahlen. Eine quantitative Angabe seitens der Herstellerfirma fehlt bei dem Präparat. Ursachen für die verhältnismäßig niedrigen Werte könnten in der Herstellung der Suspension zu suchen sein. Möglicherweise waren die untersuchten Kapseln auch weniger frisch oder wurden während des Vertriebs ungünstig gelagert.

Zu den übrigen pharmazeutischen Präparaten lagen keine vergleichbaren Untersuchungsergebnisse vor. Die ermittelten Zahlen konnten lediglich mit den nach Angaben des Herstellers errechneten Werten verglichen werden; hier zeigte sich gute Übereinstimmung.

Bei den Sauermilchprodukten wurden die Gesamtkeimzahlen den von KURMANN (93) geforderten Werten gegenübergestellt; eine direkte Bewertung der Recovery für Bifidobakterien ist also nicht möglich. Die ermittelten Gesamtkeimzahlen entsprachen weitgehend diesen geforderten Werten. Vergleiche mit den von REUTER (96) ermittelten Keimzahlen in fermentierten Milchprodukten wurden nicht vorgenommen, da REUTER nur zum Laktobazillengehalt quantitative Aussagen macht.

Alle untersuchten Nährböden mit Ausnahme der Selektivmedien YN 6 und Petuely waren für die Züchtung von Bifidobakterien und auch von Laktobazillen aus pharmazeutischen Präparaten geeignet. Eine Unterscheidung der beiden Gattungen ist auf-

grund makroskopischer Merkmale leicht möglich. Auf Petuely konnten Bifidobakterien aus Arzneispezialitäten selektiv gezüchtet werden, das Wachstum auf YN 6 war unregelmäßig.

Für den Nachweis von Bifidobakterien aus fermentierten Milchprodukten waren Milch und Eugon am besten geeignet; alle anderen Nährböden ergaben kein regelmäßiges Wachstum.

Die bei der Untersuchung von Arzneispezialitäten und Sauermilchprodukten ermittelten Keimzahlen unterschieden sich auf den einzelnen Nährböden nicht deutlich voneinander; je nach Probe ließen sich auf unterschiedlichen Nährböden die höchsten Keimzahlen ermitteln.

Die Koloniemorphologie schwankte bei den Laktobazillen aus Arzneispezialitäten von Präparat zu Präparat stark, oft traten zwei verschiedene Kolonieformen auf. Bei einem der Präparate (Ribolac^R) wurde eine biochemische Untersuchung durchgeführt. Es erwies sich, daß die beiden enthaltenen Komponenten Laktobazillen waren, die sich anhand biochemischer Merkmale jedoch nicht eindeutig einer Spezies zuordnen ließen. REUTER (96) hatte im Präparat Ribolac^R aus der Schweiz *L. casei* anstelle von *L. acidophilus* nachgewiesen. Auch bei zahlreichen anderen Arzneispezialitäten, bei denen als einziger mikrobieller Bestandteil *L. acidophilus* angegeben war, konnte REUTER nicht nur diese eine Spezies nachweisen; oft traten andere Bakterien daneben auf oder es wurde eine andere Spezies als *L. acidophilus* gefunden. Die Beobachtungen in der vorliegenden Studie lassen die Vermutung zu, daß REUTERS Beobachtungen auch heute noch gültig sein könnten.

Bifidobakterien kommen regelmäßig im menschlichen Darm, in der Mundhöhle und der Vagina vor. Um die Tauglichkeit der Nährböden für klinisches Untersuchungsmaterial zu testen, wurden daher Speichel, Stuhl und Vaginalsekret untersucht.

Der Nachweis von Bifidobakterien aus dem Stuhl ist dadurch

erschwert, daß Bifidobakterien zusammen mit einer Vielzahl anderer, schnell wachsender und gut züchtbarer Gattungen vorkommen. Im Speichel und Vaginalsekret treten Bakterien mit ähnlichen Nährstoffansprüchen und Wachstumseigenschaften wie beispielsweise Laktobazillen in hoher Anzahl neben geringeren Mengen von Bifidobakterien auf.

Nach WILDFÜHR (99) lassen sich Bifidobakterien aus Speichel nur selten nachweisen. WERNER (98) gelang die Züchtung auf einem durch Blutzusatz modifizierten Rogosa Agar. In der vorliegenden Studie konnten auf den neun ausgewählten Nährböden keine Bifidobakterien gezüchtet werden. Da es jedoch nicht Ziel der Untersuchung war, spezielle Züchtungsverfahren für Bifidobakterien aus dem Speichel zu untersuchen, sondern die Tauglichkeit der Nährböden für den Nachweis von Bifidobakterien aus verschiedenen Untersuchungsmaterialien zu prüfen, wurden die Untersuchungen eingestellt mit der Erkenntnis, daß offenbar für die Züchtung von Bifidobakterien aus Speichel nur ganz spezielle Nährböden und Verfahren geeignet sind.

Bei der Untersuchung von Stuhlproben wurde der Nachweis von Bifidobakterien in der ersten Hälfte dieses Jahrhunderts fast ausschließlich aus Säuglingsstuhl versucht. Später war man der Meinung, Bifidobakterien könnten nach reichlichem Milchgenuß auch in den Faezes von Erwachsenen nachweisbar sein (56). 1949 untersuchte BOVENTER (16) Stühle von Erwachsenen, die Mischkost zu sich nahmen, auf dem Nährboden nach BLAUROCK. Bei BOVENTER machte der Anteil der Bifidobakterien 1/3 bis 1/4 der gefundenen Flora aus; allerdings konnte "bei einigen Personen...*B. bifidum* trotz eifrigen Suchens nicht gefunden werden." BOVENTER charakterisierte in seiner Untersuchung die Gattung *Bifidobacterium* erstmals als "obligaten Vertreter ...der Darmflora des Erwachsenen."

Heute liegen die quantitativen Angaben für Bifidobakterien aus dem Erwachsenenstuhl etwa bei 10^9 bis 10^{11} Kolonien / g

Untersuchungsmaterial (24); eine Zusammenstellung der von verschiedenen Autoren ermittelten Werte ist in Tab. 2 enthalten. In der vorliegenden Studie lagen die Zahlen im Durchschnitt um ein bis zwei logarithmische Dekaden niedriger. Die Werte für Laktobazillen und grampositive Kokken entsprachen dagegen den in der Literatur bekannten Werten (Tab. 3, 25). Die Zahlen für gramnegative Stäbchen lagen ebenfalls um ein bis zwei logarithmische Dekaden niedriger als in der Literatur beschrieben.

Da die untersuchten Nährböden auch für andere Gattungen wie Laktobazillen oder Enterokokken ein geeignetes Substrat darstellen, werden möglicherweise die enthaltenen wuchsfördernden Stoffe hauptsächlich von diesen schnellwachsenden Arten verbraucht, so daß Bifidobakterien im Wachstum gehindert werden. Die Nährböden bieten dagegen sicher keine optimale Grundlage für die Züchtung von gramnegativen Stäbchen der Stuhlflora, und so liegen auch hier verständlicherweise die Werte unter den in der Literatur angegebenen Zahlen.

Für den Nachweis von Bifidobakterien aus Stuhl erwies sich keines der nichtselektiven Medien Blut, Milch, Tomaten und Eugon als geeignet. Bifidobakterien ließen sich auf diesen Nährböden meist überhaupt nicht anzüchten; sie wurden von anderen Spezies überwuchert.

Auch der selektive YN 6-Agar war ungeeignet für die Kultur von Bifidobakterien aus dem Stuhl, die Bakterien ließen sich praktisch nie anzüchten; andere Arten wuchsen dagegen reichlich. Auch auf dem Petuely-Agar konnten nur selten Bifidobakterien aus dem Stuhl kultiviert werden. Der Nährboden zeigte selektive Eigenschaften gegenüber Laktobazillen, nicht jedoch gegenüber Eubakterien und gramnegativen Stäbchen. Mit der Selektivität muß man offenbar eine so starke Hemmung der Wachstumsförderung in Kauf nehmen, daß ein regelmäßiger Nachweis von Bifidobakterien nicht mehr gewährleistet ist;

dafür spricht auch die winzige Kolonieform, die sich bei den Bifidobakterien auf Petuely beobachten läßt.

Lediglich die beiden Selektivnährböden Sorbinsäure und Rogosa eigneten sich für den Nachweis von Bifidobakterien aus dem Stuhl; auch für den Nachweis von Laktobazillen sind sie geeignet. Die nachgewiesenen Werte für Bifidobakterien lagen allerdings auch auf diesen Nährböden niedriger als erwartet; eine vollständige Selektivität für Bifidobakterien und Laktobazillen war nicht feststellbar.

Demnach erfüllt keines der untersuchten Nährmedien die Anforderungen, die an einen optimalen Nährboden für den Nachweis von Bifidobakterien aus dem Stuhl gestellt werden sollten. Ein Nährboden, der speziell mit Wachsstoffen für Bifidobakterien angereichert wird und für Laktobazillen weniger geeignet ist, könnte diesen Zweck erfüllen. Einem solchen Nährboden sollten dann eventuell Selektivstoffe zugesetzt werden; die Differenzierung könnte aber auch, wie in der vorliegenden Studie, mikroskopisch erfolgen, oder es könnten die Verdünnungsstufen zur Koloniezählung herangezogen werden, auf denen nur noch Bifidobakterien wachsen. Die letztgenannte Methode wäre in der vorliegenden Arbeit nicht anwendbar gewesen, da Bifidobakterien auf keinem der Nährböden regelmäßig den dominierenden Anteil der züchtbaren Flora darstellten.

Die Kultur von Bifidobakterien aus dem Vaginalsekret ist insbesondere dadurch erschwert, daß Bifidobakterien neben einem dominierenden Anteil von Laktobazillen auftreten. In der vorliegenden Untersuchung waren Bifidobakterien nur bei einem Teil der Proben nachweisbar (3 Proben, 27,2 %). In einer dieser Proben wurden außer Bifidobakterien keine anderen Arten gefunden. Während BOVENTER ein Auftreten von Bifidobakterien in 95 % der untersuchten Sekrete angab (16) konnte BARTLETT nur aus 2 % der Sekrete, bzw. bei 5 % der Probandinnen Bifidobakterien nachweisen (6). Die von BARTLETT ermittelten Werte

lagen bei 8,6 ($\log_{10}$) für *B. breve* und damit deutlich über den Werten, die in der vorliegenden Untersuchung ermittelt wurden (Mittelwert 3,16; $\log_{10}$).

Die Tatsache, daß Bifidobakterien nur in so geringen Mengen und nur auf dem Petuely-Nährboden nachgewiesen werden konnten, erhärtet die These, daß Bifidobakterien durch Laktobazillen in ihrem Wachstum behindert werden.

Während in der Literatur über ein vermehrtes Auftreten von Bifidobakterien bei Schwangeren berichtet wird (58), waren in der vorliegenden Untersuchung bei keiner der beiden schwangeren Frauen Bifidobakterien aus dem Vaginalsekret nachweisbar.

Sowohl bei der Untersuchung von pharmazeutischen Präparaten und Sauermilcherzeugnissen als auch bei der Prüfung von biologischem Material zeigte sich, daß Bifidobakterien nur dann regelmäßig und mit guter Recovery mit dem getesteten Verfahren nachweisbar sind, wenn möglichst wenige Bakterien andere Gattungen daneben vorliegen; besonders Arten mit ähnlichem Nährstoffbedarf stören den quantitativen Nachweis. Inwieweit sich dieses Phänomen auch bei anderen Untersuchungen bemerkbar machte, läßt sich kaum beurteilen, da meist entweder Angaben zum Isolationsverfahren oder aber quantitative Angaben fehlen.

Sind nicht allzu große Mengen anderer Bakterien im Untersuchungsmaterial enthalten, so lassen sich mit den untersuchten nichtselektiven und selektiven Nährböden quantitativ und qualitativ gute Ergebnisse erzielen.

Kommt eine große Anzahl anderer Arten, wie im Stuhl, oder ein dominierender Anteil ähnlicher Gattungen, wie im Speichel und Vaginalsekret, neben Bifidobakterien vor, so ist auf nichtselektiven Nährböden ein Nachweis meist gar nicht möglich. Für das Untersuchungsmaterial Stuhl erwiesen sich in der vor-

liegenden Arbeit die Nährböden Rogosa und Sorbinsäure als am besten geeignet; der Nachweis aus Vaginalsekret gelang nur auf Petuely; aus Speichel ließen sich Bifidobakterien nicht züchten.

8.5. Schlußbetrachtung

Für die Kultur von Bifidobakterien und Laktobazillen wurde in der Literatur eine ganze Anzahl von Nährböden beschrieben. Beim genaueren Vergleich zeigt sich, daß die Nährmedien sich zum Teil stark ähneln. Viele Autoren benutzten für ihre jeweiligen Untersuchungen einen speziell von ihnen konzipierten Nährboden, von dem sie annahmen, daß er für die Kultur von Bifidobakterien oder Laktobazillen aus dem jeweiligen Untersuchungsmaterial am besten geeignet sei. Vergleichende Studien zu den Nährböden wurden nur in den wenigsten Fällen vorgenommen. Meist war es Ziel der Untersuchungen, Bifidobakterien aus Stuhl oder aus Sauermilchprodukten nachzuweisen oder einzelne Stämme anzuzüchten, mit denen dann weiterführende Studien durchgeführt wurden.

Aus der Vielzahl der Nährböden wurden für die vorliegende Arbeit einige besonders charakteristische ausgewählt und auf ihre Eignung für verschiedene Untersuchungsmaterialien getestet.

Es zeigte sich, daß einfach herstellbare Fertignährböden für die Züchtung von Bifidobakterien gut geeignet sind, wenn isolierte Stämme vorliegen oder wenn eine begrenzte Anzahl anderer Mikroorganismen daneben vorkommt, wie dies beispielsweise bei Arzneyspezialitäten und fermentierten Milchprodukten der Fall ist. Für diese Untersuchungen ist es nicht notwendig, kompliziert zusammengesetzte Spezialnährböden zu verwenden. Die Ausbeute war im allgemeinen auf allen untersuchten Nährmedien gut und Bifidobakterien ließen sich an ihrer Kolonie-

form leicht erkennen. Am regelmäßigsten wuchsen die Bifidobakterien auf Eugon-Agar.

Nichtselektive Bifidobakteriennährböden, deren Zusammensetzung der Literatur entnommen war, wie die Medien nach BLAUROCK oder OCHI, zeigten in dieser Arbeit keine Vorteile gegenüber Fertignährböden.

Der Nachweis von Bifidobakterien wird schwierig, wenn im Untersuchungsmaterial gleichzeitig diverse andere Arten, die durch schnelleres und unkompliziertes Wachstum charakterisiert sind, auftreten. Dieses Problem stellt sich bei der Untersuchung von Stuhlproben. Keiner der nichtselektiven Nährböden konnte hier sinnvoll eingesetzt werden. Die speziell für Bifidobakterien entwickelten Selektivmedien YN 6 und Petuely ermöglichten meist gar keine Züchtung aus dem Stuhl. Allein auf den Laktobazillen-Selektivnährböden Rogosa und Sorbinsäure konnten Bifidobakterien der Stuhlflora kultiviert werden. Bifidobakterien wuchsen auf den Nährböden zusammen mit Laktobazillen; auch andere Arten wurden nicht vollständig gehemmt. Die Wachstumsrate lag im Vergleich mit Literaturangaben zu niedrig. Ein idealer Nährboden für Bifidobakterien aus dem Stuhl konnte demnach in der Studie nicht ausgemacht werden.

Aus dem Untersuchungsmaterial Speichel ließen sich in der vorliegenden Arbeit keine Bifidobakterien kultivieren. Auch aus Vaginalsekret gelang der Nachweis nicht regelmäßig. Nur der gegenüber Laktobazillen selektiv wirkende Petuely-Agar war für die Züchtung von Bifidobakterien aus diesem Untersuchungsmaterial geeignet.

Insgesamt läßt sich die von RAŠIĆ und KURMANN (58) getroffene Aussage bestätigen, daß es keinen Nährboden gibt, der für den Nachweis von Bifidobakterien aus den verschiedenen Untersuchungsmaterialien gleichermaßen geeignet ist.

Bei dem pharmazeutischen Präparat Omniflora^R, das Bifidobakte-

rien und Laktobazillen enthält, war die Wachstumsrate der Bifidobakterien im Vergleich mit REUTERS Untersuchungsergebnis (96) zu niedrig. Aus Biodyn Trinkjoghurt, das als einziges der untersuchten Sauermilcherzeugnisse neben Bifidobakterien auch Laktobazillen enthält, wuchsen Bifidobakterien nur auf wenigen Nährböden und in niedrigen Konzentrationen. Diese Tatsachen und die Beobachtungen bei Speichel und Vaginalsekret lassen den Schluß zu, daß Bifidobakterien besonders dann schlecht zu züchten sind, wenn sehr ähnliche Gattungen wie Laktobazillen in großer Anzahl ebenfalls im Untersuchungsmaterial vorkommen.

Nach SCARDOVI variiert die Empfindlichkeit von Bifidobakterien gegenüber Antibiotika wie Polymyxin, Neomycin, Kanamycin, Streptomycin, Gentamycin und Nalidixinsäure stark von Spezies zu Spezies (14). Das könnte eine Ursache für das unregelmäßige Wachstum der Bifidobakterien auf YN 6 und Pectuely in der vorliegenden Untersuchung sein, daneben mag die Empfindlichkeit der Nährböden eine Rolle spielen.

SCARDOVI schlägt in Bergey's Manual (14) für den Nachweis von Bifidobakterien aus verschiedenen Untersuchungsmaterialien den nichtselektiven TPY-Nährboden vor, mit dem Argument, daß die Züchtung von Bifidobakterien wegen der unterschiedlichen Resistenzlage der Stämme auf antibiotikahaltigen Nährböden nicht immer gelänge. Aufgrund der Ergebnisse in der vorliegenden Studie erscheint es sinnvoll, nicht den vorgeschlagenen TPY-Agar, sondern einen Fertignährboden wie Eugon, Rogosa oder Sorbinsäure zu verwenden, da die praktische Arbeit dadurch erleichtert wird und kein besonderer Vorteil des TPY-Mediums zu erkennen ist. Ein Säurezusatz, wie ihn die Medien Sorbinsäure und Rogosa enthalten, scheint den Nachweis von Bifidobakterien nicht zu stören. Für bestimmte Untersuchungsmaterialien sind aber wohl noch andere selektive Zusätze nötig.

Da die bisher erprobten Selektivstoffe demnach für die Züchtung

von Bifidobakterien noch nicht optimal geeignet sind, erscheint es sinnvoll, andere Selektivstoffe, insbesondere Antibiotika anderer Gruppen als die bisher verwendeten, zu erproben.

Es wäre erstrebenswert, eine Abgrenzung gegenüber Laktobazillen und anderen Gattungen mit ähnlichem Nährstoffbedarf zu erreichen, denn nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie behindert diese Begleitflora das Wachstum der Bifidobakterien oft erheblich. Interessant könnte in diesem Zusammenhang auch eine eingehendere Untersuchung von unterschiedlichen Wuchsstoffen für Laktobazillen und Bifidobakterien sein. Die Ergebnisse bei der Untersuchung der Nährböden PYST und Petuely sprechen dafür, daß derartige Studien möglicherweise zu Erfolgen führen könnten. PYST ist ein spezieller Laktobazillennährboden ohne Selektivstoffe, Bifidobakterien wurden zwar nicht unterdrückt, die Wachstumsrate lag jedoch deutlich niedriger als auf anderen Medien. Petuely-Agar, der 0,01 % Nalidixinsäure enthält, erlaubt die selektive Züchtung von Bifidobakterien gegenüber Laktobazillen aus allen Untersuchungsmaterialien. Allerdings wachsen auch die Bifidobakterien unregelmäßig und als schlecht zählbare Kolonien.

Aus den Ergebnissen der Studie zeigt sich, daß eine selektive Züchtung von Bifidobakterien mit den heutigen Methoden nicht in befriedigendem Maße möglich ist. Alle Untersuchungen, bei denen Bifidobakterien allein aufgrund einer vermeintlich selektiven Züchtungsmethode identifiziert wurden, sind also kritisch zu bewerten. "Identification of a bacterial strain as bifidobacterium is unreliable unless special procedures are used...Cultural and physiological characters are largely shared by other bacteria"(14), heißt es auch in Bergey's Manual.

Zusammenfassung

- In der vorliegenden Arbeit wurden selektive und nichtselektive feste Nährmedien auf ihre Eignung für den quantitativen Nachweis von Bifidobakterien vergleichend untersucht.
- Die folgenden Nährböden wurden untersucht: Eugon-Agar, APT-Agar (All purpose Media with Tween), Rogosa-Agar, Sorbinsäure-Agar, Tomatensaft-Agar, Milch-Agar, Blut-Agar, PYST-Medium (Pepton-Hefeextrakt-Saccharose-Tween-Medium), YN 6-Medium (Hefeextrakt-Nalidixinsäure-Medium nach RESNICK und LEVIN), Blaurock-Agar (Leber-Zystin-Milchzucker-Agar nach BLAUROCK, TPG-Medium (Tryptikase-Phyton-Glukose-Medium nach ATCC); Ochi-Medium (Glukose-Leber-Medium nach OCHI), Petuely-Nährboden, VL-Agar (Fleisch-Hefe-Agar nach BEERENS)
- Die Untersuchungsmethoden, insbesondere die anaeroben Präparations- und Züchtungsverfahren sowie die Suspensionstechnik, wurden in Vorversuchen auf die Eignung für diese Studie geprüft. Alle Stämme wurden daraufhin in den folgenden Versuchen durch Schütteln von 1 Minute Dauer in phosphatgepufferter Kochsalzlösung pH 7,2 - 7,4 suspendiert; die Agarplatten wurden bis zur Auswertung vier Tage in Metall-Anaerobentöpfen (Whitley) bebrütet.
- Zur Messung der Ausbeute und Selektivität der verschiedenen Nährböden wurden Standardstämme von 15 Spezies des Genus Bifidobacterium, 3 Spezies des Genus Lactobacillus und weitere 66 Spezies von grampositiven Kokken, Enterobakteriazeen, sowie anaeroben grampositiven und gramnegativen Stäbchen, die in der Normalflora des Menschen vorkommen, in bestimmter Dichte suspendiert, verdünnt, auf die Agarplatten gespatelt und gezählt.
- Die Brauchbarkeit der Nährböden in der Praxis wurde an Arzneimitteln und Diätetika, die lebende Bifidobakterien oder Laktobazillen enthalten, an fermentierten Milchprodukten

und an Proben vom Menschen - Stuhl, Speichel und Vaginalsekret - untersucht.

- Die Standardstämme der Bifidobakterien und Laktobazillen wuchsen auf allen geprüften Nährböden; auf Milch- und Petuely-Agar war die Ausbeute im Vergleich schlechter. Die selektive Wirkung gegenüber taxonomisch fremden Spezies war allgemein gering, am besten auf Rogosa-, Sorbinsäure- und Petuely-Agar; der letztere wirkte auch gegen Laktobazillen selektiv.
- Für die quantitative Bestimmung von Bifidobakterien aus Stuhlproben waren nur die Selektivnährböden zu gebrauchen. Die ermittelten Keimzahlen lagen zwischen 6,54 und 10,95 ($\log_{10}$), im Durchschnitt deutlich unter den mikroskopisch oder mit Optimalmedien bestimmten Werten. Der Nachweis von Bifidobakterien aus Vaginalsekret war nur auf Petuely-Agar möglich; die Keimzahlen lagen bei 3,16 ($\log_{10}$). Im Speichel ließen sich Bifidobakterien nur ausnahmsweise finden und wurden deshalb in dieser Studie nicht systematisch untersucht.
- Ein Selektivmedium, das die Anforderungen des quantitativen Nachweises von Bifidobakterien für mikroökologische Untersuchungen am Menschen besonders gut erfüllt, konnte unter den in dieser Studie geprüften Nährböden, die alle wesentlichen Konzepte für die Kultur von Bifidobakterien repräsentieren, nicht gefunden werden. Die besten Nährböden Rogosa-Sorbinsäure- und Petuely-Agar genügen den Ansprüchen an hohe Ausbeute bei guter Selektivität und Ablesbarkeit nur zum Teil. Neue Verfahren mit bisher nicht erprobten Selektiv- und auch spezifischen Wuchsstoffen müssen deshalb entwickelt werden.

10. Literatur

- (1) Adam, A: Über Darmbakterien: Züchtung des *B. bifidus* auf Hämattinnährböden. Z. Kinderheilk. 29: 65-67 (1921)
- (2) Anaerobe Laboratory Manual. Virginia polytechnic institute and state university. Blacksburg (1972)
- (3) Ayebo, A.D. , Angelo, L.A., Shahani, K.M.: Effect of ingesting *Lactobacillus acidophilus* milk on fecal flora and enzyme activity in humans. Milchwissenschaft 35: 730-733 (1980)
- (4) Azuma, N., Yamauchi K., Mitsuoka, T.: Bifidus growth promoting activity of a glycomacropeptide derived from human casein. Agric. Biol.Chem. 48: 2159-2162. In Dairy Sci. Abstr. 47: 112 (1985)
- (5) Barnes, E.M., Ingram, M.: The effect of redox potential on the grown *Clostridium welchii* strains isolated from horse muscle. J.Appl.Bact. 19: 117-128 (1956)
- (6) Bartlett J.G. et al. : Quantitative bacteriology of the vaginal flora. J. Infect.Dis. 136: 271-277 (1977)
- (7) Bartlett, J.G., Sutter, V.L., Finegold, S.M.: Anaerobic pleuropulmonary disease: Clinical observations and bacteriology in 100 cases. In: Anaerobic bacteria, role in disease. Bawlow A.(ed.) Charles C. Thomas, Springfield. (1974)
- (8) Basten, J. et al. : Beiträge zur Methodik der Untersuchung der Bakterienflora des Säuglingsstuhls - zur Kenntnis seiner wichtigsten Bakterientypen. Z. Hyg.Infektkr. 77: 282-288 (1914)
- (9) Bayer, A.S.: Lactobacillemia - Report of nine cases. Amer.J.Med. 64: 808-813 (1978)

- (10) Beerens, H.; Tahon-Castel, M.M.: Infections humaines à bactéries anaérobies non toxigènes. Presses Académiques Européennes. Brüssel (1965)
- (11) Belzer, R.: Vergleichende Untersuchungen von Enterokokken-selektivnährböden. Diss. München (1983)
- (12) Berg, R.W.; Sandine, W.E., Anderson, A.W.: Identification of a growth stimulant for lactobacillus sanfrancisco. Appl. Environ. Microbiol. 42: 786-788 (1981)
- (13) Bergey's Manual of determinative bacteriology. 8 th ed. The William and Wilkins Company, Baltimore (1975)
- (14) Bergey's Manual of systematic bacteriology. Vol.2. 1 st ed. The William and Wilkins Company, Baltimore (1986)
- (15) Blaurock, G.: Zur Physiologie der Bifidusbakterien. Mschr. Kinderheilk. 68: 304-309 (1937)
- (16) Boverter, K.: Bacterium bifidum und seine Bedeutung. Ergebn. Hyg. Bakt. Immfrschg. exp. Ther. 26: 193-234 (1949)
- (17) Briggs, M.: An improved medium for lactobacilli. J. Dairy Res. 20: 36-40 (1953)
- (18) Cahn C: Über die nach Gram färbbaren Bacillen des Säuglingsstuhles. Zbl. Bakt. Orig. I 30: 721-726 (1901)
- (19) Cavalli-Sforza, L.: Biometrie. 3. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1972)
- (20) Cox, C.P., Briggs, M.: Experiments on growth media for lactobacilli. J. Appl. Bact. 17: 18-26 (1954)

- (21) Daeschl, M.A. et al.: Mutation and selection of *L. plantarum* strains that do not produce carbon dioxide from malate. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 419 (1984)
- (22) Dawes, I.W., Sutherland, I.W.: *Physiologie der Mikroorganismen*. Verlag Chemie, Weinheim (1978)
- (23) Dehnert, J.: Untersuchung über die grampositive Flora des Brustkindes. II. Mitteilung. *Zbl. Bakt. Orig.* I 196: 66-83 (1957)
- (24) Dowell, V.R.: Method and techniques for identification. In: *Anaerobic bacteria, role in disease*. Bawlow, A. et al. (ed.) Charles C. Thomas, Springfield Ill. (1974)
- (25) Drasar, B.S.: Some factors associated with geographical variations in the intestinal microflora. In: *The normal microbial flora of man*. Skinner, F.A., Carr, C.G. (ed.). Academic Press. London (1974)
- (26) Drasar, B.S., Hill, M.I.: *Human intestinal flora*. Academic Press, London (1974)
- (27) Eggerth, A.H.: The Gram-positive non sporebearing anaerobic bacilli of human faeces. *J. Bact.* 30: 277-279 (1935)
- (28) Evans, J.B., Niven, C.F.: Nutrition of the heterofermentative lactobacilli that cause greening of cured meat products. *J. Bact.* 62: 599-603 (1951)
- (29) Gilliland, S.E., Speck, M.L.: Detection of *Lactobacillus acidophilus* in feces of humans, pigs and chickens. *Appl. Microbiol.* 30: 541-545 (1975)
- (30) Gilliland, S.E., Speck, M.L.: Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 15-18 (1977)

- (31) Goldin, B.R.: Effect of diet and lactobacillus acidophilus supplements on human fecal bacterial enzymes. J. Natl. Cancer Inst. 64: 255-261 (1980)
- (32) Gyllenberg, H.; Carlberg, G.: The dominance of a specific nutritional type of lactobacillus bifidus in breast-fed infants. Acta Path. Microbiol. Scand. 42:380-384 (1958)
- (33) Haenel, H.: Human normal and abnormal gastrointestinal flora. Americ. J. Nutrit. 23: 1433-1439. In: Dairy Sci. Abstr. 32: 155 (1970)
- (34) Hardie, J.M., Bowden, G.H.: The normal microbial flora of the mouth. In: The normal microbial flora of man. Skinner, F.A., Carr, J.G. (ed.). Academic Press, London (1974)
- (35) van Houte, H., Gibbons, R.I., Pulkkinen, A.J.: Ecology of human oral lactobacilli. Infection and Immunity 6: 723-729 (1972)
- (36) Hurley, R. et al.: Microflora of the vagina during pregnancy. In: The normal microbial flora of man. Skinner, F.A.; Carr, J.G. (ed.). Academic Press. London (1974)
- (37) Jawetz, E., Melnick, J.L.; Adelberg, E.A.: Medizinische Mikrobiologie. Springer Verlag, Berlin (1977)
- (38) Kolb, H: Mikrobiologische Therapie - ein ausleitendes Heilverfahren. Erfahrungsheilkunde 32: 600-603 (1983)
- (39) Kotarski, S.F., Savage, D.C.: Models for study of the specificity by which indigenous lactobacilli adhere to murine gastric epithelia. Infection and Immunity 26: 966-975 (1979)

- (40) Kulp, W.L.: An agar medium for plating lactobacillus acidophilus and lactobacillus bulgaricus. Science 66: 512-513 (1927)
- (41) Lauer, E.: Physiologische und biochemische Untersuchungen zur Taxonomie der Gattung Bifidobacterium Orla-Jensen 1924. Diss., München (1974)
- (42) Lauer, E., Kandler, O.: Mechanismus der Variation des Verhältnisses Acetat/Laktat bei der Vergärung von Glucose durch Bifidobakterien. Arch. Mikrobiol. 110: 271-277 (1976)
- (43) Lerche, M., Reuter, G.: Beitrag zur Methodik der Isolierung und Differenzierung von aerob wachsenden Laktobazillen (Genus L. Beijerinck). Zbl. Bakt. Orig. I 179: 354-370 (1960)
- (44) de Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E.: A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bact. 23: 130-135 (1960)
- (45) Marsh, P., Martin, M.: Oral microbiology. 2 nd ed. American Society of Microbiology, Washington (1984)
- (46) Mayer, J.B.: Wechselwirkung zwischen Diät, Darmflora und Viren. Physik. Med. Rehabilitation 10: 16-24 (1969)
- (47) Mayer, J.B., Yaboa, J.K.: Die erste erfolgreiche orale Insulinbehandlung eines diabetischen Kindes mit Bifiduminsulin. Therapiewoche 29: 1205-1212 (1979)
- (48) Metchnikoff, E.: The prolongation of life. 1 st ed. Putmans Sons, New York (1907)

- (49) Mitsuoka, T.: Vergleichende Untersuchungen über die Bifidobakterien aus dem Verdauungstrakt von Menschen und Tieren. Zbl. Bakt. Orig. I 210: 52-64 (1969)
- (50) Mitsuoka, T.: Vergleichende Untersuchungen über die Laktobazillen aus den Faeces von Menschen, Schweinen und Hühnern. Zbl. Bakt. Orig. I 210: 33-51 (1969)
- (51) Moore, W.E.C., Cato, E.P.; Holdeman, L.V.: Anaerobic bacteria of the gastrointestinal flora and their occurrence in clinical infections. J. Infect. Dis. 119: 641-649 (1969)
- (52) Müting, D.: Untersuchung über die Wirkung einer Bacterium-bifidum-Milch auf Darmflora und Leberfunktion bei Leberzirrhosekranken mit portaler Hypertension. Therapiewoche 33: 6856-6865 (1983)
- (53) Naylor, J.: A note on the use of Rogosa and modified Rogosa medium for the enumeration and culture of lactobacilli. J. Appl. Bact. 19: 102-104 (1956)
- (54) Noack, S.: Auswertung von Meß- und Versuchsdaten mit Taschenrechner und Tischcomputer. de Gruyter, Berlin (1980)
- (55) Orla-Jensen, S.: The lactic acid bacteria. Høst, Kopenhagen (1919)
- (56) Orla-Jensen, S.: The lactic acid bacteria. Vol. 1, Ergänzungsband. Ejnar Munksgaard, Kopenhagen (1943)
- (57) Petuely, F.: Ein einfacher vollsynthetischer Selektivnährboden für den L. bifidus. Zbl. Bakt. Orig. I 166: 95-99 (1956)

- (58) Rašić, J.L.; Kurmann, J.A.: Bifidobacteria and their role. Birkhäuser, Basel (1983)
- (59) Resnick, I.G.; Levin, M.A.: Quantitative procedure for enumeration of bifidobacteria. Appl. Envir. Microbiol. 42: 427-432 (1981)
- (60) Resnick, I.G.; Levin, M.A.: Assessment of bifidobacteria as indicators of human fecal pollution. Appl. Envir. Microbiol. 42: 433-438 (1981)
- (61) Reuter, G.: Vergleichende Untersuchungen über die Bifidusflora im Säuglings- und Erwachsenenstuhl. Zbl. Bakt. Orig. I 191: 486-507 (1963)
- (62) Reuter, G.: Erfahrungen mit Nährböden für die selektive mikrobiologische Analyse von Fleischerzeugnissen. Arch. Lebensmittelhyg. 19: 53-57, 84-89 (1968)
- (63) Roberts, E.C.; Snell, E.E.: An improved medium for microbiological essays with lactobacillus casei. J. Biol. Chem. 163: 499-509 (1946)
- (64) Robins-Browne, R.M. et al.: The fate of ingested lactobacilli in the proximal small intestine. Amer. J. Clin. Nutrit. 34: 514-519 (1981)
- (65) Rogosa, M; Mitchell, J.A.: Induced colonial variation of a total population among certain lactobacilli. J. Bact. 59: 303-308 (1950)
- (66) Rogosa, M.; Mitchell, J.A.; Wiseman, R.F.: A selective medium for the isolation of oral and fecal lactobacilli. J. Bact. 63: 132-133 (1951)
- (67) Rote Liste 1987. Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie (Hrsg.), Aulendorf (1987)

- (68) Rusch, V. (Hrsg.): Dysbiosetherapie, Symbioselenkung.
Herborn (1978)
- (69) Sandine, W.E.: Roles of lactobacillus in the intestinal tract. J. Food Protect. 42: 259-262 (1979)
- (70) Scardovi, V., Crociani, F.: Bifidobacterium catenulatum, bifidobacterium dentium and bifidobacterium angulatum: Three new species and their desoxyribonucleic acid homology relationship. Int. J. Syst. Bact. 24: 6-10 (1974)
- (71) Seeliger, H.P.R.: Die sogenannte Dysbakterie. Dtsch. med. Wschr. 109: 243-245 (1984)
- (72) Sonnenwirth, A.C.: Intestinal anaerobes in blood cultures. In: Anaerobic bacteria, role in disease. Bawlow, A. et al. (ed.) Charles C. Thomas, Springfield Ill. (1974)
- (73) Speck, M.L.: Interactions among lactobacilli and man. J. Dairy Sci. 59: 338-343 (1976)
- (74) Speck, M.L.: Preparation of lactobacilli for dietary uses. J. Food Protect. 42: 65-67 (1979)
- (75) Staat, R.H., Gawronski, T.H.; Schachtele, C.F.: Detection and preliminary studies on dextranase-producing microorganisms from human dental plaque. Infection and Immunity 8: 1009-1016 (1973)
- (76) Tanaka, R., Mutai, M.: Improved medium for selective isolation and enumeration of bifidobacterium. Appl. Envr. Microbiol. 40: 866-869 (1980)
- (77) Teraguchi, S. et al.: (Enumeration of bifidobacterium in dairy products). Jap. J. Bact. 33: 753-761. In: Dairy Sci. Abstr. 42: 253-254 (1980)

- (78) Tissier, H.: Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (Etat normal et pathologique). Diss., Paris (1900)
- (79) Tomarelli, R.M. et al.: The nutrition of variants of lactobacillus bifidus. J. Biol. Chem. 181:879-888. In: Dairy Sci. Abstr. 13: 479 (1951)
- (80) Trovatelli, L.D.; Mateuzzi, D.: Presence of bifidobacteria in the rumen of calves fed different rations. Appl. Envr. Microbiol. 32: 470-473 (1976)
- (81) Vera, H.D.: The ability of peptones to support surface growth of lactobacilli. J. Bact. 54: 14 (1947)
- (82) Wallhäüßer, K.H.: Sterilisation - Desinfektion - Konservierung. Thieme Verlag, Stuttgart (1978)
- (83) Washington, J.A.; Martin, W.J.; Hermanns, P.E.: In vitro susceptibility of bacteria from blood cultures. In: Anaerobic bacteria, role in disease. Balows et al. (ed.) Charles C. Thomas, Springfield Ill. (1974)
- (84) Werner, H.: Anaerobierinfektionen, Pathogenese, Klinik, Therapie, Diagnostik. Thieme Verlag, Stuttgart (1985)
- (85) Williams, W.L., Broquist, H.P., Snell, E.E.: Oleic acid and related compounds as growth factors for lactic acid bacteria. J. Biol. Chem. 170: 619-630 (1947)
- (86) Wilson, G.S.; Miles, A., Parker, M.T.: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. Vol 1. 1st ed. (1984)
- (87) Yokoyama, M.T., Carlson, I.R., Holdeman, L.V.: Isolation and characteristics of a skatole producing lactobacillus sp. from the bovine rumen. Appl. Envr. Microbiol. 43: 837-842 (1977)

Anhang

- (88) Persönliche Mitteilung Fa. E. Merck, Darmstadt
- (89) Persönliche Mitteilung Südmilch AG, Stuttgart
- (90) Finegold, S.M., Davies, A., Miller, L.G. : Comparative effect of broad-spectrum antibiotics on non-sporeforming anaerobes and normal bowel flora. Ann.N.Y. Acad. Sci. 145, 268 (1967)
- (91) Gyllenberg, H., Niemelä, S.: A selective method for the demonstration of bifid-bacteria (*Lactobacillus bifidus*) in materials tested for fecal contamination. J.Sci. Agric. Soc. Finland 31: 94-97 (1959)
- (92) Hosatte, A.: Comparaisons biochimiques entre deux variétés de *Bifidus*, espèces *Bifidobacterium bifidum*, de la flore intestinale du nourrisson. Diss. Dijon (1964)
- (93) Kurmann, J.A.: Die Bifidobakterienkultur im milchverarbeitenden Betrieb. Dtsch. Molk. Ztg. 104: 468-475 (1983)
- (94) Raynaud, M.: (The bifidus factor 2). Sem. Hôp. Paris 35: 240-255 (Ann. Pédiat.:8-23). In: Dairy Sci. Abstr. 24 142 (1962)
- (95) Reuter, G.: Erfahrungen mit Nährböden für die selektive mikrobiologische Analyse von Fleischerzeugnissen. Arch. f. Lebensmittelhygiene: 84-89 (1968)
- (96) Reuter, G.: Zusammensetzung und Anwendung von Bakterienkulturen für therapeutische Zwecke. Arzneimittelforschung 19: 103-109 (1969)

- (97) Shimada, K. et al.: (Techniques for viable cell counts of bifidobacteria in fermented milk) J. Food. Hyg. Soc. jap. 18: 537-546. In: Dairy Sci. Abstr. 40: 465-466 (1978)
- (98) Werner, H.: Zum Vorkommen von Bifidusbakterien und morphologisch ähnlichen Keimen in der Mundhöhle Erwachsener. Zbl. Bakt. Orig. I 193: 331-342 (1964)
- (99) Wildführ, G., Wildführ, W.: Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Epidemiologie . Bd.2. Thieme Verlag, Leipzig (1977)

Herrn Prof. Dr. G. Ruckdeschel, der mir das Thema der vorliegenden Arbeit freundlicherweise überließ, danke ich sehr herzlich für alle Unterstützung und wertvolle Hinweise bei der Durchführung meiner Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem Frau Veigl, Frau Merz, Herrn Pfaller und Herrn Zimmerer vom Institut für Medizinische Mikrobiologie im Klinikum Großhadern, die mich in vielerlei Hinsicht bei der Durchführung der praktischen Versuche unterstützt haben; insbesondere danke ich Frau Kirschstein für ihre fleißige Hilfe.

Frau Schulz sei für ihre Unterstützung bei der Reinschrift der Tabellen gedankt.

Lebenslauf

Am 29. Juni 1956 wurde ich als Tochter des Arztes Dr. Heinz Goerke und der Zahnärztin Dr. Ilse Goerke geb. Schumacher in Kumla / Schweden geboren.

Im Jahre 1957 übersiedelte ich mit meinen Eltern nach Berlin und 1969 nach München, wo ich seit dieser Zeit lebe. Ich bin verheiratet und habe eine Tochter.

- | | |
|-------------|---|
| 1962 - 1975 | Besuch von Grundschule und Gymnasium in Berlin, München und Icking - Abitur |
| 1975 - 1977 | Studium der Germanistik und Anglistik an der Universität München |
| 1977 - 1979 | Ausbildung als Medizinisch-technische Laboratoriumsassistentin an der Walner-Schule in München - Staatsexamen |
| 1979 - 1983 | Studium der Pharmazie an der Universität München, Pharmaziepraktikum - Staatsexamen und Approbation |
| 1984 - 1986 | Tätigkeit als Apothekerin im Klinikum Großhadern der Universität München |

